



Fluori-18 leimatun trifluoriboraatin automatisoidun radiosynteesin kehitys ja käyttö kupari-katalysoidussa atsidi-alkyyini sykloadditioreaktiossa

Maisterintutkielma

Iida Hirssö

Ohjaaja: Anu Airaksinen

Kemian ja molekyyli-tieteiden maisteriohjelma

Helsingin yliopisto

07/2020



HELSINGIN YLIOPISTO
Helsingfors Universitet
University of Helsinki

MATEMAATTIS-LUONNONTIEDELLINEN TIEDEKUNTA
MATEMATISK-NATURVETENSKAPLIGA FAKULTETEN
FACULTY OF SCIENCE

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Kemian osasto		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree programme Kemian ja molekyyli-tieteiden maisteriohjelma	
Tekijä – Författare – Author Iida Hirso			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Fluori-18 leimatun trifluoriboraatin automatisoidun radiosynteesin kehitys ja käyttö kupari-katalysoidussa atsidi-alkyyini-sykloadditioreaktiossa			
Työn laji – Arbetets art – Level Maisterintutkielma		Aika – Datum – Month and year 07/2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 85+22
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Kohdennettuun PET-kuvantamiseen sopivia spesifisiä radiolääkeaineita on kehitetty viimeisen kymmenen vuoden aikana aktiivisesti. Tiettyyn reseptorityyppiin sitoutuvien biomolekyylien käyttö kuvantamisessa sujuvoittaa syöpien diagnosointia ja nopeuttaa hoitosuunnitelmia. Tällaisia molekyyliä ovat muun muassa vasta-aineet, peptidit ja oligonukleotidit. Biologisesti aktiivisia molekyyliä on pitkään radioleimattu radiometalleilla, mutta tarve ¹⁸F-radioleimauksille on noussut radionuklidin positroniemissio-ominaisuuksien takia. Biomolekyylien radiolääkeainekesä kulmakiveksi on noussut makromolekyylien herkkyys tyypillisille ¹⁸F-radioleimausolosuhteille. Biomolekyyliä voidaan radioleimata joko suoraan biomolekyyliin tai epäsuoraan proteettiseen ryhmän avulla. Kliinisesti käytössä jo pitkään olleita ¹⁸F-radiolääkeaineita, kuten [¹⁸F]fluori-deoksi-glukoosi ([¹⁸F]FDG) ja [¹⁸F]-N-sukkinimidyli-fluori-bentsoaatti ([¹⁸F]SFB), on hyödynnetty PET-kuvantamisessa biokonjugoituna sopivaan peptidiin. Isotooppiseen ¹⁹F-¹⁸F vaihtoreaktioon (IEX, engl. isotopic exchange) soveltuvat proteettiset ryhmät soveltuvat hyvin suoraan biomolekyylien radioleimaukseen, kun ne on valmiiksi biokonjugoitu molekyylin klik-reaktiolla. Tällaisia proteettisia ryhmiä ovat muun muassa Si-¹⁸F-, B-¹⁸F- ja Al-¹⁸F-sidoksia sisältävät molekyyli.</p> <p>[¹⁸F]Fluoriboraatit ovat osoittautuneet hyödyllisiksi työkaluiksi peptidien ¹⁸F-leimaukseen. Erityisesti alkyyinirakenteista kahtaisionista [¹⁸F]alkyyliammonium-metyyli-trifluoriboraattia ([¹⁸F]AMBF₃ eli [¹⁸F]1) on radioleimattu biokonjugoituna useaan eri peptidiin hyvällä in vivo stabiiliisuudella. [¹⁸F]1 biokonjugointi peptidiin perustuu kuparikatalysoituun atsidi-alkyyini-sykloadditioon. Tämän maisterintutkielmatyön tarkoituksena oli optimoida automatisoitu radiosynteesi [¹⁸F]1:lle. Lisäksi työssä määritettiin radioleimausolosuhteet kuparikatalysoidun atsidi-alkyyini sykloadditiiossa muodostetulle trifluoriboraatin ja tetratsiinin johdannaiselle, [¹⁸F]AMBF₃-PEG₄-mTz:lle ([¹⁸F]F2).</p> <p>[¹⁸F]1 syntetisoitiin kaksivaiheisella synteesillä booripinakoliesterin substituutioreaktiolla, minkä jälkeen booripinakoliesteri fluorattiin trifluoriboraatiksi kaliumbifluoridilla, KHF₂, 72 % saannolla. [¹⁸F]2 syntetisoitiin [¹⁸F]1:sta ja mTz-PEG₄-atsidista kahden tunnin kuparikatalysoidulla klik-reaktiolla huoneenlämmössä 63 % saannolla. Molemmat proteettiset ryhmät ¹⁸F-radioleimattiin IEX-reaktiolla pyridatsiini-HCl-puskuriliuoksessa (1.0 M, pH 2.0), johon radioaktiivinen [¹⁸F]fluoridi lisättiin μQMA-patruunasta konsentroituna 0,9 % NaCl-liuoksessa 10-20 μl:ssa. [¹⁸F]1 radioleimattiin toistuvasti automatisoidulla radiosynteesillä 47 % radiokemiallisella saannolla (RCY) 99,9 % puhtaudesta radio-TLC-määrityksen perusteella (TLC, Thin Layer Chromatography = Ohutlevykerroskromatografia). [¹⁸F]2 radioleimattiin manuaalisella pipetoinnilla toistettavasti kohtuullisella RCY:llä 23-38 % puhtausluokassa 95-99,2 %. Molaariset aktiivisuudet (MA) olivat suoraan verrannollisia käytettyyn lähtöaktiivisuuteen: esimerkiksi yli 1 GBq lähtöaktiivisuudella [¹⁸F]1:n MA oli vastaavasti 1,12-1,22 GBq/μmol. Merkkiaineiden lipofiilisuusmääritysten perusteella logD_{7,4}-arvoiksi saatiin: [¹⁸F]1:lle -1,28 ± 0,33 ja [¹⁸F]2:lle -0,43 ± 0,25.</p> <p>[¹⁸F]1 toimii hyvänä proteettisena ryhmänä peptidien ¹⁸F-radioleimauksessa useisiin eri kuvantamiskäyttötarkoitukseen. Sen farmakologisia ja toksikologisia profiileja on tosin vielä tutkittava ennen kliinistä käyttöön ottoa. Tutkielmassa optimoitiin radiosynteesi, joka mahdollistaa myös muiden potentiaalisten trifluoriboraattien ¹⁸F-radioleimauksen säteilyturvallisesti. [¹⁸F]Fluoridin konsentroidi on radiosynteesin haastavin vaihe, joka voitaisiin korvata sopivilla vaihtoehtoisilla menetelmillä vielä tehokkaammaksi kuin μQMA-patruunalla.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords [¹⁸ F]fluoriboraatit, isotooppinen vaihtoreaktio, fluori-18, tetratsiinijohdannaiset, klik kemia			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited E-thesis			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaaja Anu Airaksinen			

Sisällysluettelo

1 Johdanto.....	1
2 Kirjallisuuskatsaus.....	2
2.1 Positronisäteilijät ja PET kuvantamisen periaatteet.....	2
2.2 Fluori-18 kemia.....	5
2.3 Fluori-18 tuotanto	6
2.4 Nukleofiiliset ^{18}F -substituutioreaktiot	7
2.5 Elektrofiiliset ^{18}F -leimausreaktiot.....	11
2.6 Yleisimmät fluori-18 leimatut prosteettiset ryhmät.....	14
2.7 [^{18}F]Trifluoriboraatit.....	20
2.8 Bio-ortogonaaliset reaktiot ^{18}F -radioleimauksissa.....	26
3 Tutkimusosuus.....	30
3.1 Työn tausta ja tarkoitus.....	30
3.2 Menetelmät ja materiaalit.....	32
3.2.1 Laitteet ja tarvikkeet.....	32
3.2.2 Kemikaalit	36
3.2.3 Liuosten valmistus.....	37
3.2.4 Yhtälöt.....	39
3.3 Orgaaninen synteesi ja karakterisointi	42
3.3.1 AMBF ₃ orgaaninen synteesi ja karakterisointi.....	42
3.3.2 AMBF ₃ -PEG ₄ -mTz orgaaninen synteesi ja karakterisointi.....	45
3.4 [^{18}F]1 radiosynteesi.....	46
3.4.1 Fluori-18 konsentroidi.....	46
3.4.2 [^{18}F]1 radiosynteesin automatisointi ja reaktio-olosuhteet.....	48
3.5 [^{18}F]2 radioleimaus	52
3.6 [^{18}F]1 ja [^{18}F]2 lipofiilisyyden määrittäminen	53
4 Tulokset ja yhteenveto.....	54
4.1 Prekursorien orgaaninen synteesi	54
4.1.1 Prekursorien karakterisointi	57
4.2 [^{18}F]1:n radiosynteesi.....	61
4.3 [^{18}F]2:n radiosynteesi.....	69
4.4 Jakautumiskertoimien määrittäminen	74
5 Johtopäätökset	77
6 Viiteluettelo	81
Liitteet.....	86

Lyhenneluettelo

ACN	Asetonitrili
AMBF ₃	N-propargyyli-N,N-dimetyyliammoniummetyylitrifluoriboraatti
AMBP _{in}	N-propargyyli-N,N-dimetyyliammonium-metyylibooripinakolaatti
CuAAC	Kupari(I)-katalysoidut atsiidi-alkyynisykloadditiot (<i>Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition</i>)
DMA	N,N-dimetyyliasetamidi
DMF	Dimetyyliformamidi
EOB	Säteilytyksen loppu, engl. end of bombardment
EOS	Synteesin loppu, engl. end of synthesis
EtOH	Etanoli
EtAc	Etyyliasetatti
[¹⁸ F]FBA	[¹⁸ F]fluoribentsoehappo
[¹⁸ F]FBAM	N-[6-(4-[¹⁸ F]fluoribentsylideeni)amino-oksyheksyyli]maleimidi
[¹⁸ F]FBEM	N-[2-(4-[¹⁸ F]fluoribentsamidi)etyyli]maleimidi
[¹⁸ F]FDG	2-deoksi-2-[¹⁸ F]fluori-D-glukoosi
[¹⁸ F]FPA	[¹⁸ F]fluoripropionihappo
[¹⁸ F]SFP	N-sukkinimidyyli-4-[¹⁸ F]fluoribentsoaatti
[¹⁸ F]TBAF	[¹⁸ F]tetrabutyyliammoniumfluoridi
[¹⁸ F]MISO	[¹⁸ F]Fluorimisonidatsoli (<i>[¹⁸F]Fluoromisonidazole; 1-(2-Nitroimidazolyl)-3-[¹⁸F]fluoro-2-propanol</i>)
[¹⁸ F]NFP	4-nitrofenyyli-2-[¹⁸ F]fluoripropionaatti
[¹⁸ F]NFSI	[¹⁸ F]-N-Fluoribentseenisulfonimidi
HCl	Suolahappo
HPLC	Korkeanerotuskyvyn nestekromatografia (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IBP _{in}	Jodimetyylibooripinakolaatti tai 2-(jodimetyyli)-4,4,5,5-tetrametyyli-1,3,3-dioksaborolaani
IEDDA	Käänteisesti elektronivajaa Diels-Alder (<i>Inverse electron demand Diels-Alder</i>)
IEX	Isotoopin vaihtoreaktio (<i>Isotopic exchange</i>)
i.v.	Suonensisäinen injektio (<i>Intravenous injection</i>)

Kryptofix/K.2.2.2	4,7,13,16,21,24-heksaoksa-1,10-diatsohisyklo[8.8.8]heksakosaani
MRI	Magneettikuvaus (<i>Magnetic resonance imaging</i>)
MS	Massaspektrometri (<i>Mass spectrometry</i>)
NaOH	Natriumhydroksidi
NaCl	Natriumkloridi
n.c.a	Ilman kantajan lisäystä (<i>no-carrier added</i>)
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
NODA	1,4,7-triaatsasyklononaani-1,4-dietikkahappo (<i>1,4,7-triazacyclononane-1,4-diacetic acid</i>)
NOTA	2-[4,7-bis(karboksimetyyli)-1,4,7-triatsonan-1-yyli]etikkahappo (<i>2-[4,7-bis(carboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl]acetic acid</i>)
PBS	Fosfaattipuskuriliuos (<i>Phosphate buffer solution</i>)
PEG	Polyetyleeniglykoli (<i>Polyethylene glycol</i>)
PET	Positroniemissiotomografia (<i>Positron emission tomography</i>)
PSL	Fotostimuloitu luminesenssi (<i>Photostimulated luminescence</i>)
PSL-IP	PSL-kuvantamislevy (<i>Photostimulated luminescence imaging plate</i>)
(μ)QMA	(Mikro) kvaternäärinen metyyliammoniumioni, (<i>(micro)quaternary methyl ammonium</i>)
RGD	RGD peptidi, Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys
RCP	Radiokemiallinen puhtaus (<i>Radiochemical purity</i>)
RCY	Radiokemiallinen saanto (<i>Radiochemical yield</i>)
MA	Spesifinen aktiivisuus (<i>Molar activity</i>)
saliini	Fysiologinen suolaliuos (<i>Natriumkloridi, NaCl, 0.9 m-%</i>)
SiFA	Pii-fluoridiakseptori eli organopiisyntoni (<i>Silicon-fluoride-acceptor</i>)
SOS	Synteesin alku (<i>Start of synthesis</i>)
SOB	Säteilytyksen alku, engl. start of bombardment
S _N Ar	Nukleofiilinen aromaattinen substituutio
S _N 2	Bimolekulaarinen nukleofiilinen substituutio
SPAAC	Jännitteen edistämä alkyyni-atsidi sykloadditioreaktio (<i>Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition</i>)
SPE	Kiinteäfaasiuutto (<i>Solid phase extraction</i>)
SPECT	Yksifotoniemissiotomografia (<i>Single photon emission computer tomography</i>)

Sstr2	Somatostatiinireseptori alatyypin 2
TCO	Trans-syklo-okteeni
TLC	Ohutlevykerroskromatografia (<i>Thin-layer chromatography</i>)
TOF MS	Lentoajan analysointilaitteeseen yhdistetty massaspektrometri (<i>Time-of-flight mass spectrometry</i>)
Tz	Tetratsiini (<i>Tetratzine</i>)
UV	Ultravioletti

1 Johdanto

Radiolääkeaineiden kehitystyössä tutkitaan jatkuvasti uusia radioleimausmenetelmiä biomolekyylisten merkkiaineiden valmistamiseen molekulaariseen kuvantamiseen positroniemissiotomografialla (PET, engl. Positron emission tomography). Biomolekyyli-merkkiaineille soveltuvat parhaiten radioleimausolosuhteet, joissa ei käytetä äkillisiä tai voimakkaita lämpötilan tai pH:n muutoksia. Lisäksi radiosynteesin on oltava nopea ja lopputuotteen puhdistuksen helppo. Tähän mennessä monia eri makromolekyyliä on radioleimattu eniten radiometalleilla, kun taas muiden positroniemitterien, kuten radiohalogeenien, soveltuvuutta vielä tutkitaan.

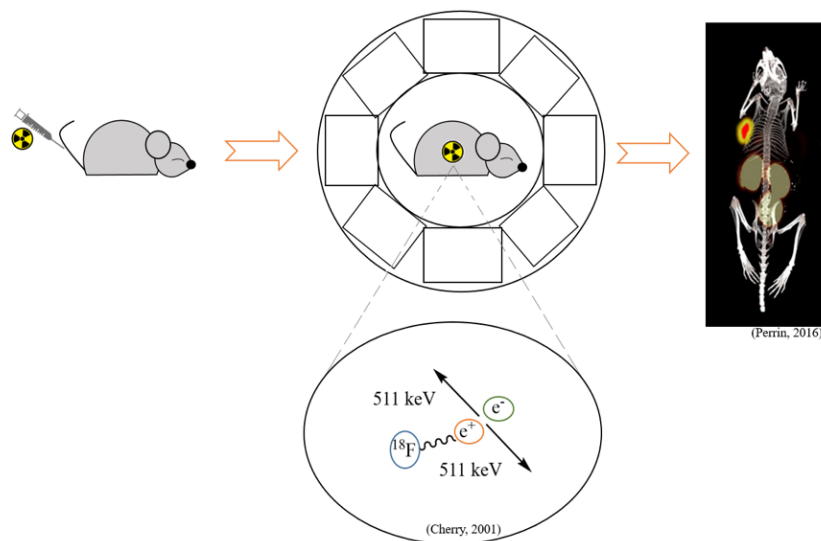
Fluori-18 on ihanteellinen radionuklidi radiokemiallisen hajoamismuodon ja puoliintumisaajan (109,8 min) takia PET-kuvantamiseen. Onnistumisia makromolekyylien ^{18}F -radioleimauksessa on saavutettu, mutta vain harvat niistä ovat kliinisessä käytössä. Radioleimausolosuhteiltaan ^{19}F - ^{18}F isotooppinen vaihdosreaktio sekä klik-kemiaan perustuvat reaktiot vaikuttavat lupaavilta biomolekyylien radioleimaukseen. Muun muassa $[^{18}\text{F}]$ fluoriboraatin konjugointi peptidiin on mahdollistanut uusien biomolekyylien radiofluorauksen korkealla molaarisella aktiivisuudella ja 30 % radiokemiallisen saannon peptidien ^{18}F -radioleimauksessa. Reaktio on nopea ja radioleimatun lopputuotteen puhdistus onnistuu helposti kiinteäfaasiuuttopatruunojen (engl. solid-phase extraction, SPE) avulla.

Tutkielman tavoitteena oli optimoida trifluoriboraattiryhmän omaaville uusille potentiaalisille radiolääkeaineille soveltuva automatisoitu radiosynteesi. Työskenneltäessä korkeilla radioaktiivisuuksilla automatisoidulla radiosynteesillä voidaan vähentää työntekijän säteilyaltistusta. Se on myös välttämätön kliinisesti käytössä olevien radiolääkeaineiden tuotannossa (GMP, Good Manufacture Practices) sekä sairaalalaboratoriossa että radiolääketeollisuudessa. Tutkielmatyössä optimoitiin $[^{18}\text{F}]$ ammoniummetyylitrifluoriboraatille ($[^{18}\text{F}]\text{AMBF}_3 = [^{18}\text{F}]\text{F1}$) automatisoitu radiosynteesi. Lisäksi työssä määritettiin radioleimausolosuhteet kuparikatalysoidun atsidi-alkyyni sykloaditiassa muodostetulle trifluoriboraatin ja tetratsiinin johdannaiselle, $[^{18}\text{F}]\text{AMBF}_3\text{-PEG}_4\text{-mTz}$:lle ($[^{18}\text{F}]\text{F2}$). Merkkiaineet syntetisoitiin kaksivaiheisen reaktion kautta. Radioleimaukseen käytetty $[^{18}\text{F}]$ fluoridi tuotettiin syklotronilla ^{18}O -rikastetusta vedestä. Radioleimattujen merkkiaineiden radiokemiallinen puhtaus (engl. radiochemical purity, RCP) määritettiin kromatografisin menetelmin.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Positronisäteilijät ja PET kuvantamisen periaatteet

Radionuklidit, jotka hajoavat emittoimalla positronin (β^+) kutsutaan positronisäteilijöiksi. Positronin osuessa materiaalissa kulkiessaan elektroneihin vapautuu kaksi energialtaan yhtä suurta 511 keV vastakkaisiin suuntiin kulkevaa koinvidenssi gammakvanttia. Tästä tapahtumasta käytetään termiä positronin annihilaatio.¹ Positroniemissiotomografiassa (PET) kuvantamisessa hyödynnetään positronin annihilaatiota radiolääkkeen tai radioaktiivisen merkkiaineen aiheuttaman radiosignaalin paikantamiseen kohteesta, johon radioaktiivinen merkkiaine on annosteltu (Kuva 1). PET-kamerassa kohdetta ympäröi sarja tuikeilmaisimia, jotka vastaanottavat koinvidenssi signaaleja. Tämän jälkeen datasta koostetaan 3D-kuva. Radioaktiivisen signaalin avaruudellinen ja anatominen paikantaminen on mahdollista, kun hyödynnetään erilaisten rakenteellisten modaali-teettien yhdistämistä, kuten tietokonetomografia (Computed Tomography, CT) ja magneettikuvaus (Magnetic Resonance Imaging, MRI). PET-kuvantamisessa on korkea spatiaalinen resoluutio (5-6 mm kliinisessä, 2-3 mm prekliinisessä). Sitä pidetään herkkänä ja kvantitatiivisena molekyyli-tason kuvantamismenetelmänä.



Kuva 1. Positroniemissiotomografian toimintaperiaate.

PET-kuvantamisen rinnalla toinen yleisimmistä kuvantamismenetelmistä on yksifotoniemissiotomografia (SPECT, single photon emission tomography), jossa positroniemittereiden sijasta käytetään gammasäteilyä emittoivia radiolääkkeitä.¹ SPECT-kuvantamiseen verrattuna PET on herkempi ja parempi spatiaalisen resoluution osalta. Sen sijaan PET-kuvantamisessa ei ole mahdollista kuvantaa montaa radionuklidia yhden kuvaussession aikana, sillä PET-skannerit havaitsevat vain 511 keV annihilaation fotonit. Molekyyli-tason kuvantamisessa erityisesti

radioaktiivisten merkkiaineiden tapauksessa kuvataan kudosten verenkiertoa ja aineenvaihduntaa, lääkeaineen jakautumista kudoksissa sekä välittäjäaineita ja reseptoreita. Spesifisen kohteen kuvantamisen kysyntä on kuitenkin nousussa ja siksi radiolääkeainetuotannossa kehitetään biomolekyylien radioleimausmenetelmiä, joilla esikohdennettu kuvantaminen olisi mahdollista.

Taulukossa 1 on esitetty esimerkkejä tyypillisimmistä kliinisessä käytössä olevista positronisäteilijöistä, niiden radiokemialliset ja -fysikaaliset ominaisuudet sekä tyypillisin tuotantotapa. Radiolääkeaineiden tuotannossa hyödynnetään radiometalleja ja lyhytikäisiä positroniemittäreitä eri lääketieteen diagnostiikassa, kuten syövän diagnostiikassa ja hoidossa.² Jotta radiometalli-isotoopit voidaan liittää haluttuun biologiseen molekyyliin, vapaa radiometalli on kelatoitava vesiliuoksessa kelaattorin avulla kehossa tapahtuvan kilpailevan transkelaation ja hydrolyysin välttämiseksi. Kelaattoreita voidaan edelleen liittää kovalenttisesti biologisesti aktiivisiin kohdemolekyyliin. Radiometalli-ioni on sitoutunut kelaattorin kautta radiolääkeaineeseen niin hyvin, että se kulkeutuu systeemisesti potilaan verenkiertoon annosteltuna kohdekudokseen kuvantamisessa. Käytössä on jo laaja valikoima erilaisia radiometalleja, joita voi käyttää eri kuvantamistarkoituksiin. Esimerkiksi PET-kuvantamisessa käytetään ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ⁸⁶Y, ⁸⁹Zr ja ⁴⁴Sc. SPECT-kuvantamisessa hyödynnettyjä radiometalleja ovat muun muassa ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ¹¹¹In ja ¹⁷⁷Lu. Jokaisella radiometallilla on eri koordinaatiokemialliset ominaisuudet vedessä, jotka on huomioitava isotooppien lääketieteellisessä sovellutuksissa ja niiden *in vivo* käyttöä varten. Radiometalleja tuotetaan tyypillisesti generaattoreilla, kuten ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga ja ⁹⁹Mo/^{99m}Tc-generaattori, tai syklotronilla, kuten ⁶⁴Cu tai ⁶⁸Ga.^{3,4}

Taulukko 1. PET-kuvantamisessa käytettyjen radionuklidien ominaisuudet ja tuotantotapa.²⁻⁴

Radionuklidi	Puoliintumisaika	Positronin maksimienergia (MeV)	Tuotantotapa
C-11	20,3 min	0,96	¹⁰ B(d, n) ¹¹ C (syklotroni)
			¹¹ B(p, n) ¹¹ C (syklotroni)
			¹⁴ N(p, α) ¹¹ C (syklotroni)
N-13	9,97 min	1,19	¹² C(d, n) ¹³ N (syklotroni)
			¹⁶ O(p, α) ¹³ N (syklotroni)
			¹³ C(p, n) ¹³ N (syklotroni)
O-15	122 s	1,72	¹⁴ N(d, n) ¹⁵ O (syklotroni)
			¹⁵ N(p, n) ¹⁵ O (syklotroni)
F-18	109,8 min	0,64	¹⁸ O(p, n) ¹⁸ F (syklotroni)
Cu-64	12,7 h	0,65	⁶⁴ Ni(p, n) ⁶⁴ Cu (syklotroni)
Ga-68	68,1 min	1,83	⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga-generaattori
			⁶⁸ Zn(p, n) ⁶⁸ Ga (syklotroni)
I-124	4,17 d	2,1	¹²⁴ Te(p, n) ¹²⁴ I (syklotroni)

Vaikka radiometallien käyttö molekulaarisessa kuvantamisessa on saanut vankan ja hyvän pohjan, radiometallin, kelaattorin ja ligandin muodostaman kompleksin käyttöön liittyy farmakokineettisiä sekä radiometallin liittyviä toksisuuskysymyksiä. Metallinuklidien toksisuusriskin takia lyhytikäisten positroniemittereiden käyttö on yleistynyt kuvantamisdiagnostiikassa, sillä lyhyen puoliintumisaikansa takia niiden säteilyaltistus potilaaseen on alhaisempi kuin pidempi-ikäisillä radionuklideilla.⁵ Radioaktiiviset isotoopit, kuten ^{15}O , ^{13}N ja ^{11}C , esiintyvät jo ei-radioaktiivisena monien yhdisteiden rakenteissa, minkä takia niiden käyttö radioleimauksessa ei muuta radiolääkeaineen farmakologisia ominaisuuksia.⁴ Niiden farmakologiset sekä -kineettiset ominaisuudet ovat identtistä ei-radioleimatun vastaavan lääkeaineen kanssa. Radionuklideja ^{18}F ja ^{124}I vastaavat ei-radioaktiiviset isotoopit puolestaan eivät esiinny luonnostaan lääkeaineissa hapen, typen ja hiilen tavoin. Tästä johtuen näillä nuklideilla leimattujen radiolääkeaineiden farmakologisia ja farmakokineettisiä ominaisuuksia pitää tutkia ja arvioida huolella ennen niiden käyttöönottoa kliiniseen diagnostiikkaan. Radiometalleihin verrattuna edellä mainitut nuklidit eivät myöskään vaadi erityistä ligandiosaa radioleimaukseen. Haasteena näiden nuklidien käytössä on ainoastaan niiden erittäin lyhyt puoliintumisaika, mikä asettaa esteitä monivaiheisille radiosynteesille.⁵

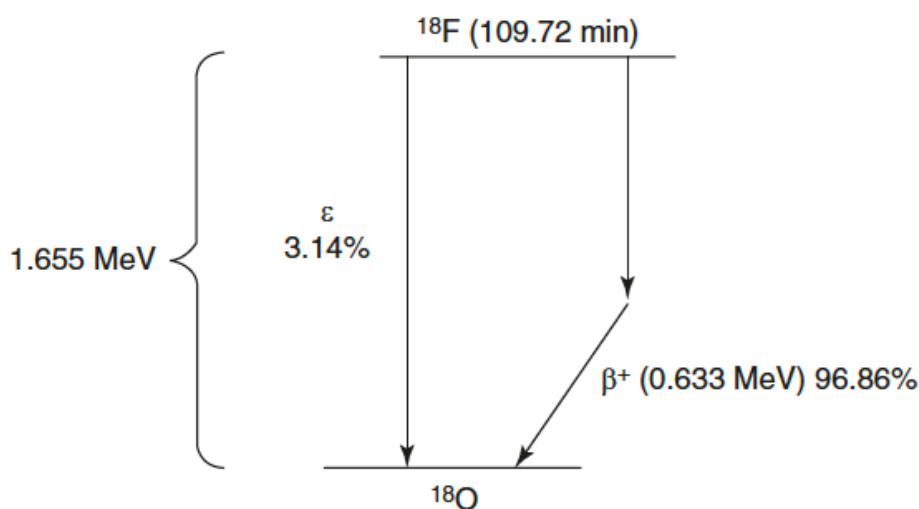
PET-kuvan laatu on riippuvainen positroniemitterin radiokemiallisen hajoamisen karakteristen ominaisuuksien vaikutuksista.¹ Positronipartikkelin kantama ennen annihilaatiota on sitä lyhyempi mitä matalaenergisempi partikkeli on kyseessä, jolloin PET-kuvan spatiaalinen resoluutio on sitä korkeampi. Erityisesti niiden radionuklidien tapauksessa, jotka eivät ole radiokemialliselta hajoamiseltaan täysin positroniemittäreitä, PET-kuvien käsittely on monimutkaisempi nykyään kehittyneiden tietokonemetodien avulla etenevä prosessi. Nykypäivän menetelmillä saadaan kuitenkin tuotettua PET-kuvia korkealaatuisena kaikilla positroniemittereillä laskennallisten menetelmien ja kehittyneiden gammailmaisimien ansiosta. Toisaalta radionuklidit, joiden radiokemiallinen hajoamisreitti ei täysin tapahdu positroniemissiolla, altistavat kuvannettavan potilaan suuremmalle radioaktiivisuusalitistukselle muiden radiokemiallisten hajoamismuotojen takia.

Molaarinen aktiivisuus (MA) kuvaa merkkiaineen aktiivisuutta ainemääräyksikköä (mooliyksikköä) kohti.⁴ Se riippuu positronisäteilijän fysikaalisista ominaisuuksista ja radionuklidin tuotantotekniikasta. Tutkimukseen vaadittu molaarinen aktiivisuus riippuu myös itse tutkimuksesta sekä tutkittavasta yhdisteestä. Korkea molaarinen aktiivisuus vastaa radioaktiivisen merkkiaineen annoksen alhaista massaa, mikä vaaditaan alhaisen määrän reseptoritutkimuksiin ja toksisille yhdisteille. Korkeimmat molaariset aktiivisuudet ovat radiolääkeaineilla, jotka on leimattu ^{11}C - ja

^{18}F -radionuklideilla. Näitä hyödynnetään haastavimmissa tutkimuksissa, kuten neuroreseptori-tutkimuksissa. Sen sijaan monia nanopartikkeli- ja vasta-ainemerkkiaineita voidaan käyttää alhaisem-malla molaarisella aktiivisuudella.

2.2 Fluori-18 kemia

Fluori-18 hajoaa stabiiliksi happi-18 isotoopiksi positroniemiission eli β^+ -hajoamisen kautta (96,9 %) ja elektronisieppauksella (3,1 %) (Kuva 2).^{4,6} Fluori-18 emittoimien positronien maksimienergia on suhteellisen alhainen (0,634 MeV), mistä johtuen niiden kantama on melko lyhyt (vedessä $2,4 \pm 0,6$ mm).⁴ Fluoria voidaan tuottaa korkealla molaarisella aktiivisuudella, ja sen teoreettinen molaarinen aktiivisuus on noin 63 TBq/ μmol (1,71 MCi).⁷



Kuva 2. Fluori-18 radiokemiallinen hajoaminen.⁶

Fluori-18 puoliintumisaika ($t_{1/2}=109,7$ min) on pitkäikäisin fluorin radioaktiivisista isotoopeista. Muihin PET-kuvantamisessa käytettyihin radionuklideihin (^{11}C , ^{13}N ja ^{15}O , taulukko 1) verrattuna fluori-18:n pitkä puoliintumisaika mahdollistaa pidemmät radiosynteesi- ja kuvantamisajat.⁴ Pitkän puoliintumisaikansa lisäksi fluori-18:lla on muitakin ominaisuuksia, joiden ansiosta se on laajasti PET-kuvantamisessa käytetty protonisäteilijä. Korkean positroniemiission hajoamisprosentin myötä radiokemiallisessa hajoamisessa muodostuu paljon positroneja, jotka parantavat kuvantamisen herkkyyttä. Samalla radiokemialliseen hajoamiseen liittyvät huolet turvallisuuden ja logistiikan osalta vähenevät. Lisäksi alhainen positronienergia (640 keV) tuottaa korkean resoluution PET-kuvia.

Fluori on jaksollisen järjestelmän elektronegatiivisin ja reaktiivisin alkuaine.⁶ Atomikooltaan pieni fluoriatomi muodostaa hiiliatomin kanssa kovalenttisia sidoksia, joiden van der Waalsin säde on 1,47

Å.⁸ Vastaava säde vety- ja hiiliatomin välisessä sidoksessa on 1,2 Å. C-F-sidos vie avaruudellisesti vähemmän tilaa kuin metyyli-, amiini- tai hydroksyyli-ryhmä. Fluorin lisäys molekyyli-rakenteeseen voi merkittävästi muuttaa yhdisteen fysiko-kemiallisia ominaisuuksia.⁹ Esimerkiksi fluorin läsnäolo voi siirtää pK_a-arvoja usean log-yksikön verran lähellä happamia tai emäksisiä ryhmiä. Vetyatomin korvaaminen fluorilla vähentää myös yhdisteen emäksisyyttä ja sitä kautta lisää yhdisteen lipofiilisyyttä sekä muokkaa yhdisteen *in vivo* biodistributioprofiilia. Fluorisubstituution on todettu parantavan yhdisteen sitoutumisaffiniteettia kohdesoluun ja metabolista tasapainoa estämällä sitoutumista metabolisesti labiileihin paikkoihin. Näitä ominaisuuksia on hyödynnetty lääkekehityksessä ja yhä useammassa lääkemolekyylin rakenteessa on fluoriatomi. Fysiko-kemialliset seuraukset on otettava huomioon myös ¹⁸F-leimattuja radiolääkeaineiden kehityksessä.

2.3 Fluori-18 tuotanto

Fluori-18 tuotetaan radiosynteesejä varten kahdessa eri muodossa: [¹⁸F]fluoridina kohtioveteen liuenneena tai molekulaarisena [¹⁸F]F₂ eli fluorikaasuna.^{4,6} Radiolääkeaineen tuotannossa käytetty muoto riippuu radiofluorausreaktiosta, jolla fluori-18 liitetään molekyylin rakenteeseen.⁶ Reaktio voi olla joko elektrofiilinen substituuatio elektronirikkaaseen molekyyliin tai nukleofiilinen substituuatio poolittomaan molekyyliin. Nukleofiilisessa substituuatiossa radioaktiivinen fluori-18 esitetään molekyyliin [¹⁸F]fluoridina vesiliuoksessa, kun taas elektrofiilisessa radiofluorauksessa fluori-18 on molekulaarisessa muodossa [¹⁸F]F₂-kaasuna.

Radiolääkeaineiden valmistuksessa [¹⁸F]F⁻:n tuotannossa käytetään eniten ¹⁸O(p, n)¹⁸F-ydinreaktiota.^{4,10} Siinä ¹⁸O-rikastettua vettä pommitetaan protoneilla, jolloin suurin osa radionuklidista muuttuu [¹⁸F]fluoridiksi kohtiovesiliuoksessa liuenneena. Nukleofiilisessa radiofluorauksessa [¹⁸F]fluoridi toimii nukleofiilina. Nestekohtion seinämä voi koostua titaniudesta, hopeasta, niobiumista tai tantalumista.⁶ Kaksi jälkimmäistä kohdemateriaalia ovat soveltuvia korkean kohtiovirran säteilytyksiin ja mahdollistavat jopa 500 GBq suuruisen [¹⁸F]fluoridin tuotannon⁶, joka on raportoitu 120 min pituisella 18 MeV protonisäteilytyksellä 145 µA kohtiovirralla¹¹.

Molekulaarista fluorikaasua ([¹⁸F]F₂) käytetään radiolääkeaineiden elektrofiilisissa ¹⁸F-leimauksissa. Esimerkiksi molekulaarista [¹⁸F]fluorikaasua voidaan tuottaa ²⁰Ne(d,α)¹⁸F reaktiolla Ne:F₂ kaasukohtiosta tai ¹⁸O(p,n)¹⁸F reaktiolla ¹⁸O:F₂ kaasukohtiosta.^{10,12} Jälkimmäinen tuotantotapa on tehokkaampi, mutta kohtiomateriaali on kallis.⁶ Kaasukohtiomateriaalien käytössä fluori-18 absorboituu kuitenkin helposti kohtion seinämiin. Molempiin tuotantomenetelmiin tarvitsee tästä

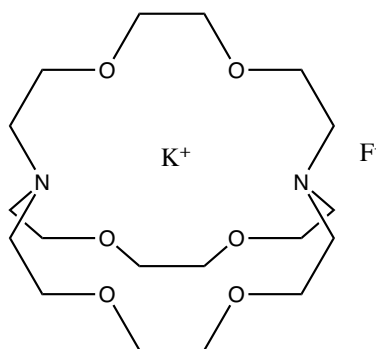
syystä lisätä alkuaine fluori-19 isotooppia, joka helpottaa $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ erotusta isotooppisen vaihtumisen kautta. Toimenpide rajoittaa maksimi MA:n saavutusta kaikilla radiolääkeaineilla. Teoreettinen saavutettavissa oleva maksimaalinen radiokemiallinen saanto (RCY) rajoittuu 50 %:iin, sillä jokainen $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ sisältää vain yhden ^{18}F -atomin.

Radiolääkeaineiden valmistuksessa ja tuotannossa tavoitellaan korkeaa molaarista aktiivisuutta ja fluori-18 tuotantotavalla on tähän vaikutusta. Fluori-18:n tuotannossa suositetaan eniten syklotronituotantoa $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ ydinreaktiolla, koska sillä $[^{18}\text{F}]\text{fluoridi-ioni}$ saadaan tuotettua kantajavapaana, korkealla molaarisella aktiivisuudella ja radiokemiallisella saannolla protonisäteilyttämällä ^{18}O -rikastettua vettä.^{6,10,13} Vesikohtioilla fluori-18 tuotetaan korkealla molaarisella aktiivisuudella.¹⁴ PET-kuvantamisessa korkean molaarisen aktiivisuuden (MA) omaavien merkkiaineiden käyttö on tärkeää, jotta mittaukseen liittyvät häiriöt voitaisiin välttää. Käytännön tuotannossa saatu MA ^{18}F -leimatuille radiolääkeaineille on 185 GBq/ μmol (teoreettinen 63 TBq/ μmol).^{15–17} Stabiilia fluoria voi löytyä useista yhdisteistä ja täten on tärkeää pystyä ylläpitämään korkea MA myös lopputuotteeseen, minkä takia on välttämätöntä valita materiaalit tarkasti ja käsitellä niitä huolellisesti.⁷ Radiolääkeaineiden käyttö kuvantamisessa kohdennetaan yleensä matalantiheyden proteiineihin, jolloin MA:n on oltava mahdollisimman korkea ja ei-radioaktiivista kantajaa oltava mahdollisimman vähän.¹⁸ Korkean MA:n radiolääkeaineita tarvitaan myös farmakologisten ja toksikologisten vaikutusten välttämiseen. Alhaisen MA:n merkkiaine voi vääristää kuvantamista ei-radioaktiivisen merkkiaineen sitoutuessa vähäisesti esiintyviin reseptoreihin tai transporttereihin.

2.4 Nukleofiiliset ^{18}F -substituutioreaktiot

Syntetisoitaessa lyhytikäisen radionuklidin sisältäviä radiolääkeaineita synteesiaika ei saisi käytännön tuotannossa ylittää kolmen puoliintumisajan pituista ajanjaksoa.¹⁶ Kliinisissä ^{18}F -nuklidin tutkimuksissa synteesiaika pidetään alle kahdessa tunnissa ($> 1\ t_{1/2}$).^{6,16} Radiolääkeaineen ^{18}F -leimauksessa $[^{18}\text{F}]\text{fluori}$ kannattaa lisätä molekyyliin mieluiten viimeisimmässä vaiheessa radioleimausprotokollassa. Tätä toimenpidettä kutsutaan usein ”loppuvaiheen radiofluoraukseksi” tai ”suoraksi leimausmenetelmäksi”, jota on helpompi soveltaa automatisoidun synteesiyksikön käyttöön.¹⁹ Monivaiheista ^{18}F -leimausmenetelmää on paljon vaikeampi soveltaa automatisoituun synteesiyksikköön. Monien yhdisteiden radiosynteesien leimauksen optimointi aloitetaan pienestä rakennuspalikasta, niin sanotusta prosteettisesta ryhmästä, jota hyödynnetään edelleen radioleimaamaan entistä monimutkaisempia molekyyilirakenteita.

Nukleofiilinen substituuutio on tehokas menetelmä radiofluorauksessa, kun $[^{18}\text{F}]$ fluori halutaan leimata alifaattiseen (alifaattinen substituuutio, $\text{S}_{\text{N}}2$) hiileen tai aromaattiseen renkaaseen (aromaattinen substituuutio, $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$).^{4,6} Nukleofiilisessa radiofluorauksessa fluorausreagenssi $[^{18}\text{F}]$ fluoridi reagoi lähtöainemolekyylin eli prekursorin kanssa muodostaen radioleimatun lopputuotteen. $[^{18}\text{F}]$ fluoridi kulkeutuu synteesiyksikköön vesiliuoksessa ^{18}O -kohtiosta. Tässä muodossa $[^{18}\text{F}]$ fluoridi on kuitenkin vesimolekyylien ympäröimänä hyvin hydratoitunut korkean varaustiheydensä takia ja siten se ei ole reaktiivinen.⁶ Fluoridi on muokattava voimakkaaksi nukleofiiliksi, jotta se liittyy prekursorimolekyylin lähtevän ryhmän tilalle ja siten nopeuttaa reaktiota.

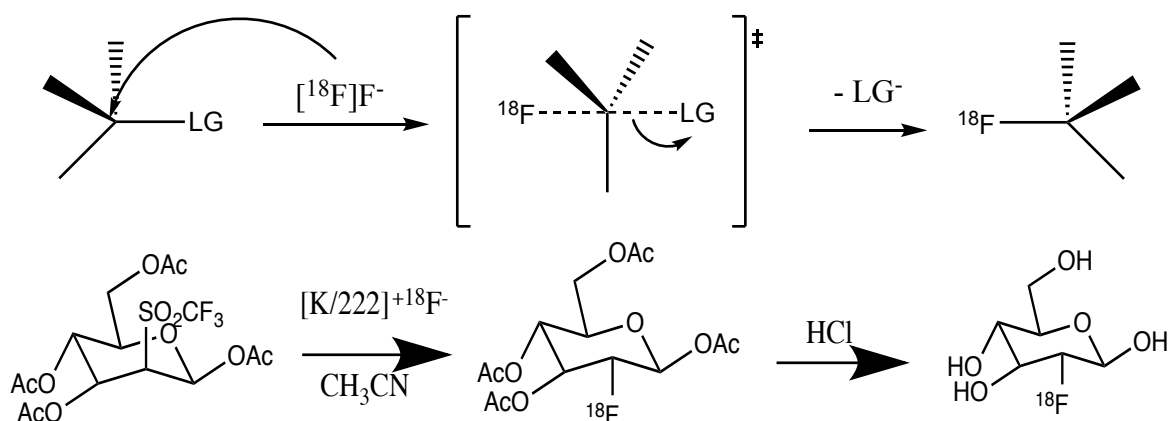


Kuva 3. Kaliumionin kompleksin muodostuminen Kryptofix-222 (K_{222}) kanssa.⁴

Kohtioveden $[^{18}\text{F}]$ fluoridi eristetään $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$:sta pidättämällä se sopivaan ioninvaihtopatruunaan, minkä jälkeen pidättynyt $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ eluoidaan patruunasta kaliumkarbonaattia sisältävällä vesi/asetonitriili-liuoksella.⁴ Faasinsiirtoreagenssin kryptofix-222 (K_{222}) lisäys $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$:sta eristämisen jälkeen on osoittautunut parantavan merkittävästi $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$:n reaktiivisuutta nukleofiilisissä ^{18}F -leimauksissa. Kationin lisäys on välttämätöntä, jotta $[^{18}\text{F}]$ fluoridi saadaan ulkoisesti varauksettomaksi, sillä kohtioveden sisältämät metalli-ionit eivät riitä ja ne voivat häiritä radioleimausta. Tällaisia isoja ja pehmeitä metalli-ioneja ovat esimerkiksi rubidium (Rb^+) tai cesium (Cs^+), kalium-ionin avulla kompleksoituja kryptandeja, kuten aiemmin mainittu Kryptofix 222, ja tetra-alkyyliammoniumsuoloja.^{16,20} K_{222} muodostaa kaliumin kanssa voimakkaan kompleksin jättäen fluoridin ”paljaaksi” ja tehden siitä voimakkaan nukleofiilin (Kuva 3), kun se on liuotettuna polaariseen ei-proottiseen liuottimeen, kuten DMF, DMSO tai asetonitriili (ACN).^{4,6} Toinen vaihtoehto $[^{18}\text{F}]\text{KF} \cdot \text{K}_{222}$ rinnalla on $[^{18}\text{F}]$ tetrabutyyliammoniumfluoridi ($[^{18}\text{F}]\text{TBAF}$).²¹ Kationin lisäksi reaktioseokseen on sisällytettävä toisen anionin lisäys reaktioseokseen, joka ei kilpaile $[^{18}\text{F}]$ fluoridin kanssa nukleofiilisissä substituuotiossa (esimerkiksi karbonaatti-, kloridi- tai hydroksidi-ioni).

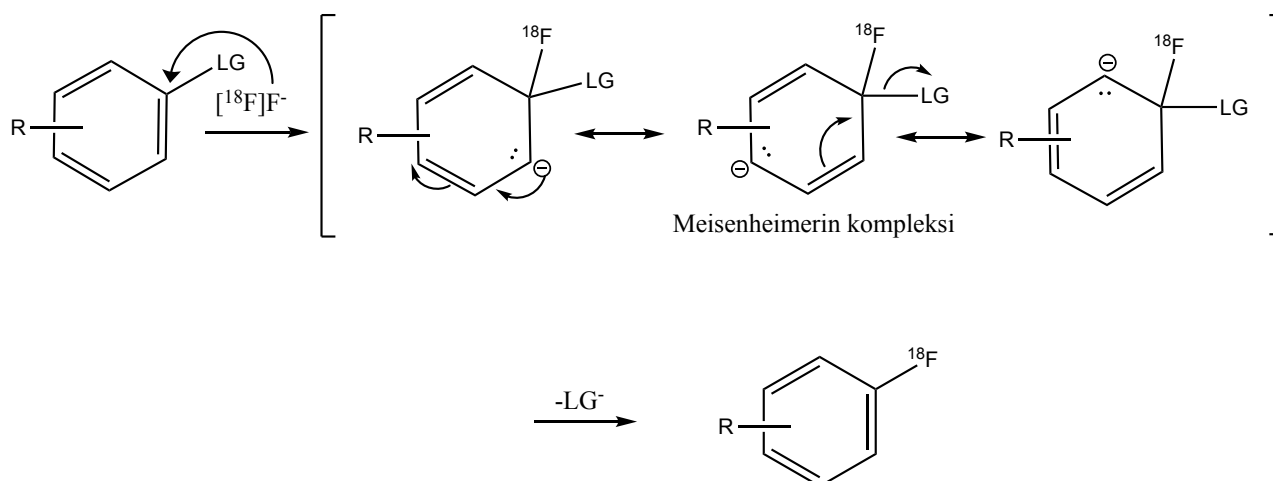
Ioninvaihtohartsista eluoitu [^{18}F]fluoridi muokataan reaktiiviseen muotoon edelleen haihduttamalla liuos atseotrooppisesti asetonitriilin kanssa. Sitten kuiva fluorausreagenssi liuotetaan orgaaniseen dipolaariseen aproottiseen liuottimeen, kuten asetonitriili (ACN), dimetyylisulfoksidi (DMSO) ja dimetyyliformamidi (DMF).^{6,22} Dipolaariset aproottiset liuottimet eivät luovuta tai vastaanota protoneja tai muodosta vetysidoksia ja niillä on suuri dipolimomentti, jolloin ne eivät myöskään häiritse leimausreaktioita.²² Atseotrooppisella tislauksella on kuitenkin kaksi haittapuolta.⁶ Ensimmäinen on sivutuotteiden muodostuminen käytettäessä emästä, minkä takia nukleofiilisen substituution käyttö rajoittuu niihin prekursoreihin, jotka eivät ole herkkiä emäksen lisäykselle. Toiseksi atseotrooppinen tislauksella on aikaa kuluttava vaihe. Näille ongelmille on kuitenkin kehitetty ratkaisuja viimeisten vuosikymmenien aikana, kuten heikosti emäksisten anionien käyttö (kaliumfosfaatti, oksalaatti, triflaatti tai mesylaatti) [^{18}F]fluoridin eluoinnissa ioninvaihtohartsista sekä kuivien liuottimien käyttö kuivaamisen nopeuttamiseksi.^{23,24}

[^{18}F]Fluoridin aktivoinnin lisäksi reagoivalla prekursorimolekyylillä on oltava sopiva lähtevä ryhmä ja aromaattisen renkaan tapauksessa rengas on aktivoitava reaktioon. Suora ^{18}F -leimaus voidaan jakaa alifaattiseen ($\text{S}_{\text{N}}2$, Kuva 4) ja aromaattiseen ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, Kuva 5) nukleofiiliseen radiofluorausreaktioihin. Alifaattinen substituutio on periaatteessa hyvin tehokas ja monet kliinisessä käytössä olevista ^{18}F -leimatuista radiolääkeaineista valmistetaan tämän reaktioreitin kautta.⁶ Edellytyksenä alifaattiselle ^{18}F -substituutiolle on, että molekyylissä on hyvä lähtevä ryhmä. Lähtevinä ryhminä voidaan käyttää halogeeneja (Cl, Br ja I), erityyppisiä sulfonaatteja (tosylaatti, nosylaatti, mesylaatti ja triflaatti) ja syklisiä rakenteita, kuten epoksidgeja ja syklisiä sulfaatteja. Lähtevän ryhmän valintaan vaikuttaa ^{18}F -leimattavan prekursorin rakenne ja reaktiivisuus. Vähemmän reaktiivisen tai steerisesti rajoitetun prekursorin tapauksessa lähtevänä ryhmänä käytetään sulfonaatteja, jotka sopivat stabilisoimaan ylimääräistä elektronitiheyttä sidosheterolyysin seurauksena. Nukleofiilinen ^{18}F -substituutio etenee joko $\text{S}_{\text{N}}1$ - tai $\text{S}_{\text{N}}2$ -mekanismilla riippuen prekursorista ja reaktio-olosuhteista. Jälkimmäisessä substituutio tapahtuu molekyylin takaa, jolloin substituutiossa tapahtuu molekyylirakenteen inversio (Kuva 4). Muita valintaan vaikuttavia asioita voivat olla lähtöaineen stabiilius ja saatavuus, ^{18}F -leimatun tuotteen erottaminen lähtöaineesta, reagensseista ja liuottimista tai mahdollisten sivutuotteiden muodostuminen. Yksi hyvä esimerkki alifaattisesta nukleofiilisestä radiofluorauksesta on 2-deoksi-2-[^{18}F]fluori-D-glukoosi synteesi (Kuva 4), jossa reaktiivisen lähtevän ryhmän trifluorimetaanisulfonaattierin, eli triflaatin, käytöllä saavutetaan erinomaiset saannot. Alifaattinen nukleofiilinen ^{18}F -substituutio tapahtuu korkeissa lämpötiloissa (noin 80-100 °C) polaarisisissa aproottisissa liuottimissa (MeCN, DMSO ja DMF).



Kuva 4. Alifaattinen nukleofiilinen (S_N2) fluori-18 substituutioreaktio 2-deoksi-2- $[^{18}\text{F}]$ fluori-D-glukoosin ($[^{18}\text{F}]$ FDG) synteysi.

Menestyksekkäin reaktioreitti ilman kantajan lisäystä on tehty $[^{18}\text{F}]$ fluoriareeneille nukleofiilisella aromaattisella ^{18}F -substituution $S_N\text{Ar}$ -mekanismilla (Kuva 5).⁶ Fluori aiheuttaa bentseenirenkaaseen hyvin vähän steeristä rakennetta, mutta elektronegatiivisuutensa ansiosta se tarjoaa aryyliarenkaaseen hyödyllisiä elektronisia ja fysikokemiallisia ominaisuuksia. Areeneja on radioleimattu ensimmäisen kerran tetrafluoriboraattivastinonia hyödyntäen Balz-Schiemann ja Wallachin reaktioilla. Kyseisellä reaktiolla ^{18}F -leimattujen areenien molaariset aktiivisuudet ja radiokemialliset saannot olivat kuitenkin alhaisia fluori-19 vastinoinin läsnäolon takia. $[^{18}\text{F}]$ fluoriareenien lisäksi heteroareeneja on ^{18}F -leimattu. Tyypillisimpiä lähteviä ryhmiä aromaattisessa nukleofiilisessä radiofluorauksessa ovat nitro- ja trimetyyliammoniumryhmät.^{20,25} Jotta nukleofiilisen substituution reaktionopeus olisi riittävä, aromaattisessa renkaassa tulee olla elektroneja puoleensa vetäviä ryhmiä renkaan orto- tai para-asemassa lähtevään ryhmään nähden: tällaisia funktionaalisia ryhmiä ovat muun muassa nitro-, ketoni-, aldehydi-, nitrili-, esteri- tai amidisubstituentit.^{6,20,25,26} Edellä mainitut ryhmät aktivoivat aromaattisen renkaan nukleofiilista aromaattista ($S_N\text{Ar}$) substituutiota varten. Erityisesti NO_2 ja $^+\text{NMe}_3$ soveltuvat tähän reaktioon parhaiten, sillä niiden elektroneja puoleensavetävä ominaisuus auttaa niitä muodostamaan negatiivisen varauksen aromaattiseen renkaaseen.⁶ Fluoridi itse voi myös toimia hyvänä lähtevänä ryhmänä. Resonanssistabiloituun Meisenheimerin kompleksin muodostumiseen tarvitaan enemmän energiaa kuin alifaattisen substituution siirtymätilan tuotteiden muodostumiseen. Siksi $S_N\text{Ar}$ reaktiomekanismi vaatii korkeat reaktiolämpötilat johtaen sivutuotteiden muodostumiseen sekä alhaisempiin RCY:n. Vastaavasti näissäkin reaktioissa suositetaan korkean kiehumispisteen liuottimia, kuten DMSO, DMF ja N,N-dimetyyliasetamidi (DMA).



Kuva 5. Aromaatinen nukleofiilinen (S_NAr) fluori-18 substituutioreaktio.⁶

Areenien ja heteroareenien ^{18}F -leimauksessa on käytetty myös siirtymämetallikatalyyttejä, kuten palladiumia ja kuparia.⁴ Pd-katalyytit ovat tuoneet merkittävän lisän radiolääkeainekemian saralla ja ne ovat laajentaneet radioleimauksia Sonogashiran, Stille ja Suzuki-Miyaura, Negishi, Sonogashira ja Buchwald-Hartwig reaktioihin.^{27–30} Yhteenvetona kohtiovedestä erottamisen sekä faasin-siirtokatalyytin lisääminen reaktiivisuuden parantamiseksi ^{18}F -leimauksessa on muistettava, että prekursorin leimaus tehdään polaarissa aprottisessa liuotuksessa, mahdolliset suojaryhmät poistetaan ja ^{18}F -leimatun lopputuotteen formulointi sekä puhdistus on suoritettava synteessin lopussa.⁶ Jotta joko HPLC:llä tai TLC:llä selvitetty reaktiosaanto olisi luotettava, on reaktioastian seinämiin tarttunut $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ huuhdeltava vedellä. Happamissa olosuhteissa muodostuu kaasumaista $[^{18}\text{F}]$ vetyfluoridia eli $[^{18}\text{F}]\text{HF}$:ää, jolloin on tärkeää varmistaa, että vapautuva kaasu pidätetään oikeilla metodeilla esimerkiksi ilmastoinnin suodattimeen.

2.5 Elektrofiiliset ^{18}F -leimausreaktiot

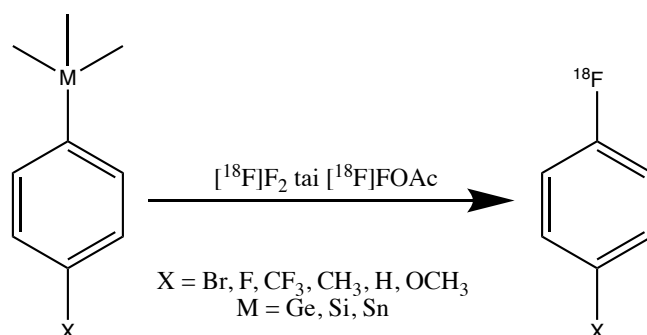
Elektrofiilisissa radiofluorausreaktioissa elektrofiilisen ^{18}F :n lähteen ($[^{18}\text{F}]\text{F}^+$) ja elektronirikkaan lähtöaineen, kuten alkeenin, aromaattisen renkaan tai karboanionin, välille muodostuu kovalenttinen sidos hiilen ja $[^{18}\text{F}]$ fluorin välille.^{4,6} Elektrofiilinen fluorisubstituutio on tehokas ja nopea tapa liittää ^{18}F -atomi molekyyliin.⁶ Leimauseriaatteet ovat yksinkertaisia ja radiohalogeenin lisäys tehdään yleensä radiosynteesin loppuvaiheessa. Reaktiomenetelmä on kuitenkin käytännössä haastava.

Elektrofiilisessa fluorauksessa käytetään lähtöaineena molekulaarista fluoria $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$.^{4,6} F_2 -kaasun käsittely on haastavaa, sillä se on hyvin reaktiivinen ja vaarallinen reagenssi. Reaktiivisuutta on

pyritty vähentämään muuttamalla fluorikaasua toiseen muotoon. Lisäksi reaktiotuotteina saatavien merkkiaineiden molaarinen aktiivisuus on alhaisempi kuin nukleofiilisissa fluorauksissa. Molekulaarisen fluorin tuotannossa käytetään kantajakaasua, jotta kohtiokaasussa on riittävästi fluoria F_2 -kaasun muodostamiseen. Kantajakaasun käyttö elektrofiilisessa radiofluorauksessa on muutenkin välttämätöntä, sillä ilman kantajakaasua fluorikaasu tarttuu tehokkaasti kohtion seinämään.

Fluorikantajan lisäyksen takia synteesituotteen molaarinen aktiivisuus heikkenee.² Elektrofiilisen radiofluorauksen käyttö radiolääkeaineiden tuotannossa on rajoittunut tilanteisiin, joissa lopputuotteelta ei vaadita korkeaa molaarista aktiivisuutta (MA noin 0.37-0.74 GBq/ μ mol).^{6,31-33} Parhaimmillaan elektrofiilisessa radiofluorauksessa päästään noin 55 GBq/ μ mol MA:han vain kohtion jälkeisellä metodilla niin, että $[^{18}F]$ fluoridikaasu muutetaan molekulaariseksi fluorikaasuksi.³¹ Elektrofiilisessa radiofluorauksessa radiokemiallinen saanto on korkeintaan 50%, sillä vain toinen $[^{18}F]F_2$:n fluoriatomeista liittyy lopputuotteeseen (^{18}F -atomi), ja radioleimatessa reagensseja $[^{18}F]$ fluorimolekyylistä puolet radioaktiivisesta atomeista häviää leimauksen aikana.⁶ Elektrofiilisessa radiofluorauksessa käytetään alifaattista ja aromaattista elektrofiilistä additioreaktioita.

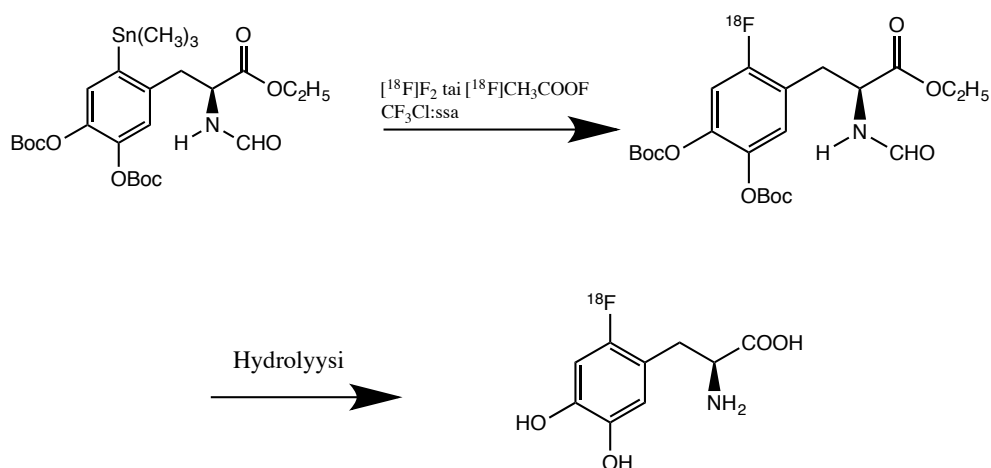
Suora elektrofiilinen radiofluoraus elektronirikkaisiin areeneihin seuraa elektrofiilisen aromaattisen substituution reaktiomekanismia (S_NAr).^{4,6} Ensimmäiseen vaiheeseen sisältyy ei-spesifinen kompleksin muodostuminen elektrofiilisen $[^{18}F]^+$ -ionin ja aromaattisen renkaan π -elektronien välille, minkä tapauksessa ei esiinny spesifistä selektiivisyyttä paikan suhteen. Joka tapauksessa substituution aikaansaamiseksi σ -kompleksin on muodostuttava, jolloin aromaattisen renkaan hiiliatomi voi liittyä kovalenttisesti elektrofiilin kanssa ja protoni eliminoituu hiilestä. Tämä vaihe on reaktiota rajoittava vaihe. Tästä seuraava vaihe on nopea protonin eliminaatio, jonka seurauksena muodostuu haluttu ^{18}F -leimattu lopputuote. Tarkkaa mekanismia $[^{18}F]F_2$:n additiosta kaksoissidokseen ei ole kuitenkaan vielä tiedetä, sillä ehdotetun siltarakenteen muodostumista fluoroniumioniin tyypillisenä haloniumionin intermediaattina halogeenien (X_2 ; $X = Cl, Br, I$) additiossa alkeeneihin ei ole vielä varmistettu.



Kuva 6. Aromaattinen aryyylitrimetyyliryhmän ^{18}F -fluoridemetallaatio ryhmän IVb organometalleilla $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ ja $[^{18}\text{F}]\text{FOAc}$ kanssa.⁶

Vaikka suoran elektrofiilisen radiofluorauksen haittapuolek rajoittavat radioleimausmetodin laaja-alaista käyttöä, näihin puutoksiin on kuitenkin tutkittu ratkaisevia sovellutuksia. Esimerkiksi vähemmän elektrofiilisten ^{18}F -leimattujen merkkiaineiden tai radiofluoridemetallaatioreaktioiden (Kuva 6) käyttöä suoran radiofluorauksen sijaan on tutkittu.⁴ $[^{18}\text{F}]$ -N-Fluoribentseenisulfonimidia ($[^{18}\text{F}]\text{NFSI}$), joka on fluorikaasuun verrattuna pehmeämpi ja paikkaselektiivisempi elektrofiilinen $[^{18}\text{F}]$ fluorausreagenssi, on käytetty fluorattujen ketonien ja alkyllisten fluoridien radioleimauksessa.³⁴ Muita samankaltaisia N-fluorireagensseja ovat muun muassa $[^{18}\text{F}]$ Selectfluorin bis(triflaatti)³⁵ ja N- $[^{18}\text{F}]$ fluoripyridiumtriflaatti³⁶. Erityisesti Selectfluorin bis(triflaatin) ja NFSI:n myötä elektronirikkaimpien yhdisteiden, kuten $[^{18}\text{F}]$ fluoriareenien, paikkaselektiivinen ^{18}F -substituutio on mahdollistunut.^{34,35}

Fluoridemetallaatiota varten tuotetaan organometalli-intermediaatteja, joiden annetaan reagoida vastaavalla fluorausreagenssin kanssa. Ensimmäinen radiosynteesi tällä reaktiolla suoritettiin $[^{18}\text{F}]$ fluori-L-DOPA:lle organotinaprekursorilla (Kuva 7).³⁷ Samalla demetallaatiota vastaavalla lähestymistavalla on radioleimattu myös $[^{18}\text{F}]$ fluori-L-tyrosiini³⁸, jonka tiedetään sitoutuvan uusiin syntetisoituihin proteiineihin ja joka voisi siten olla hyödyllinen proteiinien metabolia in vivo PET-kuvantamisessa.^{39,40} Lisäksi organometallista elektrofiilistä ^{18}F -substituutiota on käytetty $[^{18}\text{F}]$ metaminolijohdoksien radioleimauksessa, jotka ovat hyviä merkkiaineita sydämen sympaattisen hermoston toiminnan kuvantamisessa.



Kuva 7. 6-[¹⁸F]Fluori-L-DOPA:n synteesi radiofluoridemetallaatio.^{4,32,37}

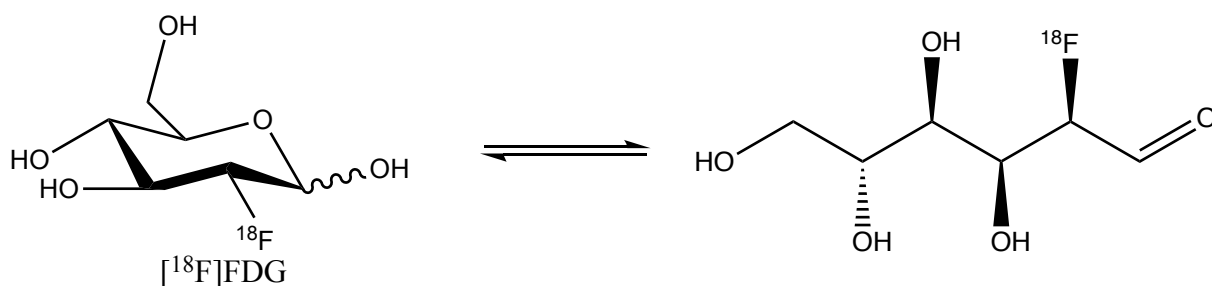
Elektrofiilista radiofluorausta voidaan käyttää suhteellisen yleisesti moniin eri yhdisteisiin, ja sitä käyttämällä voitaisiin saada käyttöön uusia ja mielenkiintoisia radiolääkeaineita. Siksi olisi hyvä, jos elektrofiilisella ¹⁸F-fluorausreaktiolla saataisiin tuotettua korkean molaarisen aktiivisuuden merkkiaineita.

2.6 Yleisimmät fluori-18 leimatut proteettiset ryhmät

Suorat radiofluorausreaktiot vaativat pH:n tai lämpötilan, jotka eivät ole normaaleja fysiologisessa ympäristössä. Monet peptidit, proteiinit, oligonukleotidit ja muut biomolekyylit eivät kestä sellaisia olosuhteita ja saattavat hydrolysoitua. Siksi biomolekyylien radioleimausta varten on kehitetty proteettisia ryhmiä, jotka radioleimataan suoraan ja konjugoidaan haluttuun molekyyliin.^{41,42} Biomolekyylit sitoutuvat proteettiseen ryhmään amiini- tai tiolifunktionaalisuuksien kautta asylaation, alkylaation, amiinin, imiinin, oksiimin tai hydratsonin muodostumisreaktioissa. Yksi yleistynyt biokonjugaatioreitti on bio-ortogonaalinen klik-kemia. Tässä osiossa keskistytään enemmän proteettisten ryhmien käyttöön peptidien ¹⁸F-radioleimauksessa. Toinen peptidien radioleimausmenetelmä perustuu [¹⁸F]fluoridin akseptorikemiaan. Luvussa 2.8 perehdytään enemmän kolmanteen peptidien radioleimaustapaan klik-kemian avulla.

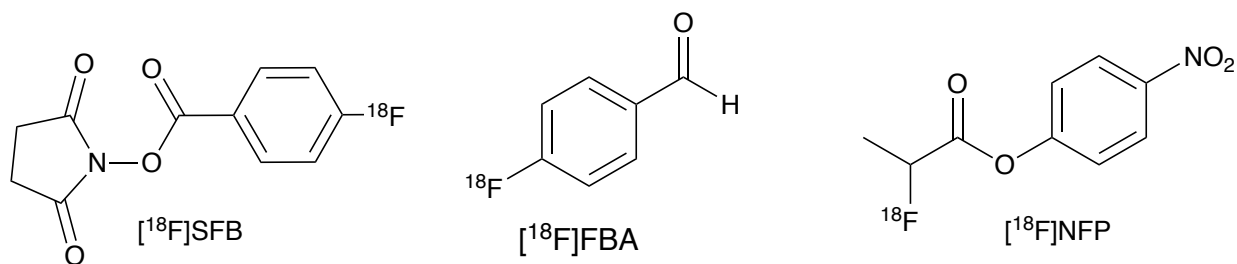
[¹⁸F]Fluori-2-deoksi-D-glukoosi ([¹⁸F]FDG) kuuluu oksiimiprekursoreihin ja sen käyttö kliinisesti on jatkunut jo pitkään.^{4,14,15} Sen sovellutuksia bio-ortogonaalisessa kemiassa, radiolääkeaine-menetelmien kehittämisessä sekä molekulaarisessa kuvantamisessa tutkitaan edelleen. Arviolta 90 % tämänhetkisistä PET-tutkimuksista on tehty [¹⁸F]FDG:llä.¹⁴ Sen toisen hiiliatomin hydroksyyli-ryhmä korvataan elektronegatiivisella fluoriatomilla, minkä ansiosta se ei metaboloidu soluissa fosforylaatiolla heksokinaasientsyymin katalysoimana vaan sen sijaan solunsisänoton jälkeen

kumuloituu glukoosia metaboloiviin soluihin. Nykyään [^{18}F]FDG valmistetaan rutinoitunein radiosynteesin kontrolloiduissa olosuhteissa nukleofiilisella ^{18}F -substituutiolla mannoositriflaatista eli 1,3,4,6-O-asetyyli-2-O-trifuori-metaanisulfonyyli-beta-B-mannopyranoosista.¹⁵ Aiemmin [^{18}F]FDG:tä radioleimattiin elektrofiilisella fluorauksella 3,4,5-tri-O-asetyyli-D-glukaalista.^{43,44} [^{18}F]FDG:n käyttö lääketieteessä ulottuu monelle osa-alueelle, kuten neurologian, kardiologian ja onkologian tutkimukseen.¹⁴ Vaikka [^{18}F]FDG:n radioleimauksessa käytetyt olosuhteet ovat biomolekyyleille kovat, Khoshbakht et al. (2016)⁴⁵ ovat hyödyntäneet kyseistä merkkiainetta [^{18}F]FDG-leimatun peptidin radiosynteesissä (reaktioaika 30 min, lämpötila 80-120 °C). Radioleimauksessa käytetyt ääriolosuhteet ovat toisaalta tärkeitä amino-oksi-funktionaalisuuden muodostumisessa.⁴⁶ Korkealla lämpötilalla ja happamalla pH:lla varmistetaan lineaarisen ja syklisen muodon välisen tasapainoreaktion vallitsevan enemmän lineaarisen muodon puolella (Kuva 8). Tällöin reaktiolle olennainen aldehydifunktio reagoi oikeissa olosuhteissa amino-oksifunktionaalisuuden kanssa.



Kuva 8. 2- ^{18}F -fluori-2-deoksi-D-glukoosin (^{18}F]FDG) syklinen ja lineaariset muodot.

Prosteettiset ryhmät voidaan jakaa kahteen kategoriaan: amino- (NH_2 -) ja tiolireaktiivisiin (SH -) prosteettisiin ryhmiin. NH_2 -reaktiiviset ryhmät kohdistuvat $\text{N}\alpha$ -terminaaliin aminoryhmiin tai lysiinin $\text{N}\epsilon$ -aminoryhmiin peptidiketjussa ^{18}F -fluoriasylaation ja ^{18}F -fluoriamidaation kautta. SH -reaktiivisia prosteettisia ryhmiä voidaan käyttää kysteiinitähteiden ja maleimidien radioleimauksessa ^{18}F -fluorialkylaatioreaktioiden avulla.⁴⁷ Kuvassa 9 on esitetty esimerkkejä käytetyistä ^{18}F -radioleimatuista prosteettisista ryhmistä.



Kuva 9. Esimerkkejä amiinireaktiivisista ryhmistä: N-sukkinimidyli-4-[18F]fluoribentsoaatti ([18F]SFB), 4-[18F]fluoribentsoehappo ja 4-nitrofenyyli-2-[18F]fluoripropionaatti ([18F]NFP).⁴⁷

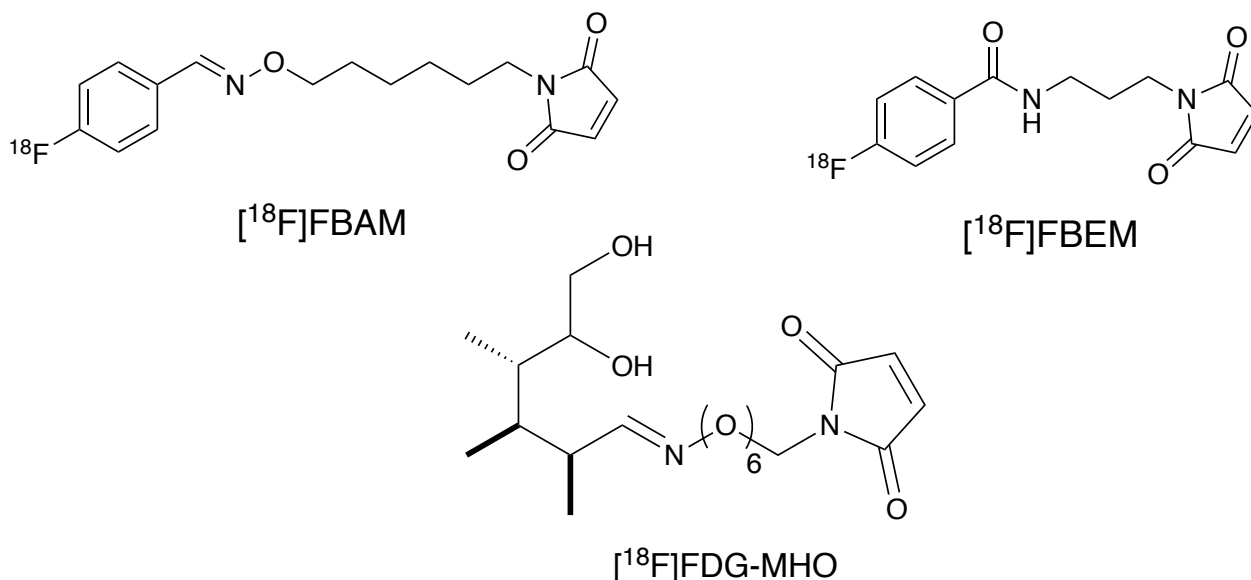
Amiinireaktiiviset prosteettiset ryhmät (Kuva 9) 4-nitrofenyyli-2-[18F]fluoripropionaatti ([18F]NFP) ja N-sukkinimidyli-4-[18F]fluoribentsoaatti ([18F]SFB) ovat vahvasti vaikuttaneet PET-kuvantamisessa ¹⁸F-leimattujen peptidien käyttöön.^{48,49} [18F]NFP on esimerkki ¹⁸F-asylaatiotekijästä, jota on eniten sovellettu syklisten glykosyloitujen pentapeptidien radiofluorauksessa RGD:n (Arg-Gly-Asp) sekvenssiin.⁴⁸ Tämä radioleimausmenetelmä sovellettiin nopeasti sairaaloihin molekulaariseen kuvaukseen $\alpha_v\beta_3$ -integriineillä syöpäpotilaille.⁴⁹

[18F]SFB puolestaan karakterisoidaan [18F]fluoribentsyyliähteeksi, joka liittyy peptidiketjun primäärisiin amiiniryhmiin amidisidoksella. Ensimmäisen [18F]SFB:n synteesin julkaisi Vaidyanathan ja Zalutsky 1992.⁵⁰ Radiokemiallinen saanto oli tuolloin 25 %, mutta siitä eteenpäin [18F]SFB:n radiosynteesijä on automatisoitu useammassa tutkimuksessa johtaen 42 % suuruisiin RCY:hin.^{51,52} Automatisoitu synteesi [18F]SFB:lle on jo kliinisessä käytössä uuden sukupolven FASTLab™ GE synteesiyksiköllä, jossa leimataan [18F]SFB:n ja PRGD:n (RGD johdannainen) biokonjugoitua radiolääkeainetta 71 ± 20 % RCY:llä ja 63 minuutin synteesiajalla.^{47,52}

[18F]Fluoribentsoehappoja, kuten [18F]fluoripropionihappo ([18F]FPA) ja 4-[18F]fluoribentsoehappo ([18F]FBA), on käytetty peptidin kiinteän faasin konjugaatiossa, jossa [18F]FBA:n radioleimauksessa on päästy 35-40 % RCY:hyn.^{53,54} [18F]FPA toimii vaihtoehtoisena fluoribentsoehappona tässä vastaavassa biokonjugaatiossa, sillä se ei todennäköisesti muuta radioleimatun peptidin kokoa ja lipofiilisyyttä niin paljoa kuin aromaattinen [18F]FBA. [18F]FPA-peptidit konjugoituivat selektiivisesti joko N-terminaaliin tai Lys-sivuketjuun 3-10 % RCY:llä alle 171 minuutin radiosynteseissä.

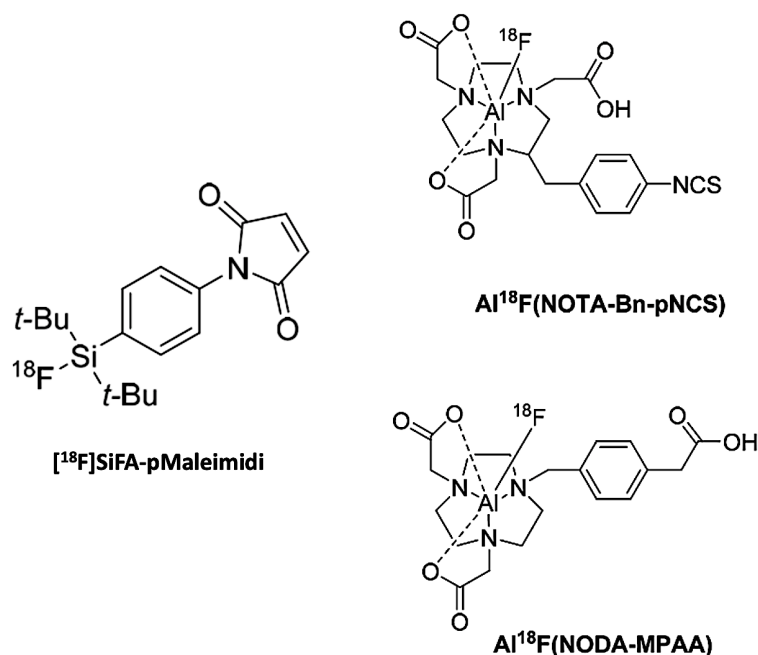
SH-reaktiivisille prosteettisille ryhmille (Kuva 10) on sen sijaan tarjolla täysin vakaita ja automatisoituja radiosynteesimenetelmiä. Esimerkiksi N-[6-(4-[18F]fluoribentsylideeni)amino-oksyheksyyli]maleimidi ([18F]FBAM) voidaan valmistaa GE TRACERlabFx synteesiyksiköllä 40

minuutin radiosynteesillä ja SPE-patruunapuhdistuksella 29 % RCY:llä.^{55,56} Toinen saman ryhmän prosteettinen ryhmä, N-[2-(4-[¹⁸F]fluoribentsamidi)etyyli]maleimidi ([¹⁸F]FBEM) syntetisoitiin 13 % RCY:llä 95 minuutissa HPLC-puhdistuksella Eckert ja Zieglerin synteesiyksiköllä.⁵⁷



Kuva 10. Tiolireaktiivisia ¹⁸F-leimattuja prosteettisia ryhmiä: N-[6-(4-[¹⁸F]fluoribentsylideeni)amino-oksyheksyyli]maleimidi ([¹⁸F]FBAM), N-[2-(4-[¹⁸F]fluoribentsamidi)etyyli]maleimidi ([¹⁸F]FBEM) ja [¹⁸F]FDG-maleimidiheksyylioksiimi.⁴⁷

[¹⁸F]Fluoridin akseptorikemia tarjoaa suoran radioleimausmenetelmän peptideille muodostamalla stabiileja Si-¹⁸F-, B-¹⁸F- ja Al-¹⁸F sidoksia. Radioleimaukset tapahtuvat isotooppisen vaihdosreaktion kautta (IEX, isotopic exchange) ¹⁹F- ja ¹⁸F-isotooppien välillä.⁴⁷ Organofluoriboraattiyhdisteet ovat tämän tutkielman kirjallisuuskatsauksen kannalta olennaisia ja niihin keskitytään enemmän osiossa 2.7 [¹⁸F]Trifluoriboraatit. Piin ja alumiinin organoprekursorit ovat boraattien lisäksi olleet tutkimuksen kohteena organopeptidiprekursorien kehittämisessä. Näiden radiosyntoneiden radioleimausreaktioiden etuja ovat reaktionopeus ja miedot reaktio-olosuhteet. Esimerkkejä piin ja alumiinin ¹⁸F-leimatuista organoprekursoreista on esitetty kuvassa 11.



Kuva 11. Esimerkkejä ^{18}F -leimatuista organopii ja -alumiinisyntoneita.⁴⁷

Organopiiisyntoneita (SiFa, engl. silicon-fluoride-acceptor) on muodostettu [^{18}F]fluoridin substituutioissa ja konjugoitu muokattuihin peptideihin.⁵⁸ Leimausmetodin hyödyllisiä puolia potilaaseen annostelun ja kuvantamisen kannalta ovat pienet prekursorimäärät (μg -luokassa) ja korkea MA. ^{18}F -Leimattujen organopiiyhdisteiden haasteena on kuitenkin niiden hydrolyyttinen stabiilisuus *in vivo*, mikä on riippuvainen piifunktionaalisuuden substituutiorakenteesta.⁵⁹ Hydrolyyttistä hajoamista voidaan merkittävästi vähentää lisäämällä piifunktionaalisuuteen kookkaita ja tilaa vieviä ryhmiä, kuten tert-butyyliryhmiä. Toisaalta tämän tyyppisten substituenttien on todettu lisäävän huomattavan paljon peptidien lipofiilisyyttä sekä kertymistä maksaan ja sappirakkoon [^{18}F]SiFA-bombesiinin ja -RGD johdosten biodistributiiossa.⁶⁰ Peptidien lisäksi [^{18}F]SiFa-yhdisteitä on hyödynnetty myös proteiinien ja nanopartikkelien radioleimauksissa hyvällä *in vivo* stabiilisuudella.^{61–65} [^{18}F]SiFa-radioleimausmenetelmää on tutkittu jonkin verran tetratsiini-johdannaisten fluorauksessa.^{66,67} Schirmacher ryhmiseen julkaisi⁶⁷ SiFa-konjugoidun tetratsiinin, [^{18}F]SiFa-OTz, radioleimauksen. Yhdisteen entsyymattista stabiilisuutta ei toistaiseksi ole vielä tutkittu. Airaksisen tutkimusryhmä julkaisi vastaavanlaisen tetratsiini-SiFa-johdannaisen, [^{18}F]SiFA-Tz⁶⁶, radioleimaus ja *in vivo* tutkimustulokset. Merkkiaine saatiin radioleimattua korkealla RCY:llä ja 1,1 GBq/ μmol MA:lla, mutta merkkiaineen konjugoituna peptidiin (albumiini) *in vivo* tutkimuksissa havaittiin kuitenkin defluorinaatiota merkittävässä määrin. Vastaavanlaiseen defluorinaatioon on törmätty havaittavissa määrin myös muissa SiFA-konjugoitujen peptidi-radiosyntonien biologisissa tutkimuksissa.⁶⁸

^{18}F -Leimattujen alumiiniakseptorien kemiaan perustuva radioleimausmenetelmä yhdistää kätevästi kelaattoreihin perustuvan radioleimauksen käyttäen peptidiä nanomoolimäärissä sekä ^{18}F -radionuklidin hyödyllisimmät fysikokemialliset ominaisuudet.⁶⁹ Fluoridi muodostaa Al^{3+} -kationin kanssa vahvan kompleksin $[\text{AlF}]^{2+}$ (sidosenergia 675 kJ/mol), joka on in vivo hyvin stabiili, mutta vapaana kompleksi kertyy fluorin tavoin luihin.^{6,69} Kompleksin muodostumisen kannalta pH:n säätämisessä (pH 4.0-5.5) on oltava tarkka, sillä liian korkeassa pH:ssa siitä muodostuu liukenemattomia alumiinihydroksidikomplekseja ja liian alhaisissa puolestaan muodostuu vaarallista $\text{H}[^{18}\text{F}]\text{F}$ -kaasua.^{4,70} Bifunktionaaliset kelaatit yhdistävät $[\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F}]^{2+}$ kompleksin haluttuun biomolekyylin. Alumiini muodostaa oktaedrisia komplekseja, jossa kelaattori tarjoaa siis viisi donoriatomia avaten samalla yhden sitoutumiskohdan fluoridianionille.⁶ Jotta leimauksessa päästään korkeisiin RCY:n lukemiin, on tärkeää erottaa kohtioveden metalli-ioniepäpuhtaudet ennen radiosynteesiä. $[\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F}]^{2+}$:a on kompleksoitu muun muassa dietyleenitriamiinipenta-asetattiin⁶⁹ (DTPA) ja sekä NODA- että NOTA-kelaattoreihin (esimerkiksi $[\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F}]^{2+}$ -NODA-MPAEM⁷¹, RCY 69-80 %). Menetelmällä leimattuihin peptideihin kuuluu okreotidi⁷², dimeerinen sykilinen RGD peptidi⁷³ ja bombesiini^{74,75}.

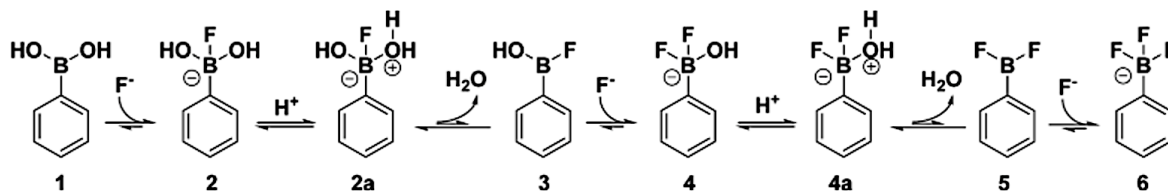
Prosteettisen ryhmän valinta on kriittinen radiolääkeaineiden kehittämisessä, sillä ne saattavat muuttaa leimattavan molekyylin fysikaalisia ja fysiologisia ominaisuuksia.^{6,47} ^{18}F -Leimatut prosteettiset ryhmät valmistetaan noin 1-3 vaiheen radiosynteseissä. Lopuksi ne pitää puhdistaa hyvin fluorausreagensseista, reagoimattomasta prekursorista ja muista mahdollisista sivutuotteista, jotka voisivat häiritä biomolekyylin konjugaatioreaktiota. Peptidien ja muiden biologisten makromolekyylien ^{18}F -leimausmenetelmien tilanne on valoisa, sillä uusia radioleimausmenetelmiä on kehitetty ja uusia innovaatioita kehitetään edelleen. Erityisesti kolmas makromolekyylien biokonjugaatiot, klik-kemia, lisää mahdollisuuksia ^{18}F fluoriakseptoreiden ja NH/SH-reaktiivisten prosteettisten ryhmien rinnalla. Klik-kemiaan perustuviin menetelmiin perehdytään tarkemmin osiossa 2.8 Biomolekyylien ^{18}F -leimaus klik-reaktioilla.

2.7 [¹⁸F]Trifluoriboraatit

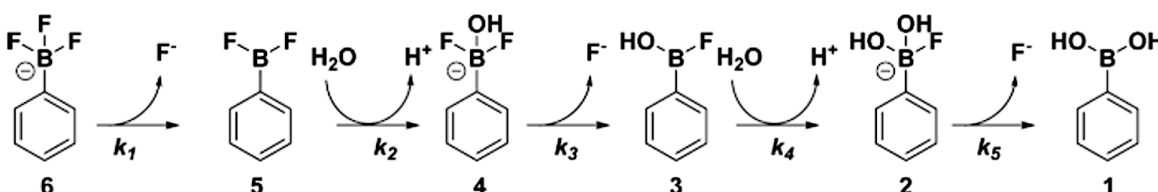
[¹⁸F]Fluoriboraattien soveltuvuutta radiolääkeainekehityksessä ja molekulaarisessa kuvantamisessa on tutkittu paljon viime vuosikymmenen aikana. Fluoriatomi muodostaa kovalenttisia sidoksia hiilen ja boorin lisäksi typen, alumiinin, piin ja fosforin kanssa.⁶ Boori- ja fluoriatomin välinen sidos on sidosennergialtaan 732 kJ/mol eli yksi vahvimpia fluorin ja metalliatomin välisistä sidoksista. [¹⁸F]Trifluoriboraattien käyttö soveltuu biomolekyylien radioleimaukseen ¹⁸F-leimatun prosteettisen ryhmän ja biomolekyylin biokonjugaatiolla.^{6,76–78} Isotooppiseen vaihdosreaktioon (IEX, engl. isotopic exchange) perustuvissa radiosynteeiseissä ei tarvitse käyttää ääriolosuhteita, kuten nukleofiilisessa ¹⁸F-substituutiolla. Biomolekyylit kestävät parhaiten fysiologisia olosuhteita, jotka ovat tyypillisiä biologisessa ympäristössä. [¹⁸F]Trifluoriboraattien radioleimaus onnistuu helposti veden läsnäollessa, alhaisessa pH:ssa (pH 2-3) eikä äkillisiä lämpötilamuutoksia tarvita.

Trifluoriboraattien suolojen synteesi onnistuu helposti ja nopeasti fluorausreagenssin, kaliumbifluoridin (KHF₂), avulla.⁷⁹ Lähtöaineena käytetään lopputuotetta vastaavaa organoboorihappoa ja -esteriä. Reaktiosaannot ovat suuria ja puhdistus onnistuu helposti uudelleen kiteytyksellä. Reaktio seuraa 3. kertaluvun reaktiokinetiikkaa ja on riippuvainen fluoridin konsentraatiosta.^{6,78} Booriatomin sisältävien merkkiaineiden ¹⁸F-radioleimaukset voidaan tuottaa suurilla radiokemiallisilla saannoilla pienissä reaktiutilavuuksissa ilman kantajan lisäystä. Jokainen trifluoriboraatin anioni sisältää kolme fluoridia: kaksi stabiilia fluori-19 atomia ja yksi fluori-18.^{6,78} Tämä yhdestä kolmeen stoikiometria tarkoittaa sitä, että optimaalisissa olosuhteissa kaksi stabiilia fluoria ja yksi fluori-18 atomi kuluu reaktiossa tuottaen RBF_3^- ryhmän. Jokaisen RBF_3^- funktionaalisenryhmän molaarinen aktiivisuus on kolmasosan kohtioveden MA:sta. Tähän ei kuitenkaan yleensä törmätä käytännössä, koska reaktio vaatii kriittisen korkean [¹⁸F]fluoridipitoisuuden. [¹⁸F]Fluoriboraattien molaarinen aktiivisuus on myös riippuvainen radioleimaukseen tuotetun [¹⁸F]F⁻:n lähtöaktiivisuudesta suhteessa prekursorin ainemäärään.

1. Happokatalysoidun trifluoriboraatin reaktiomekanismi organoboorihaposta



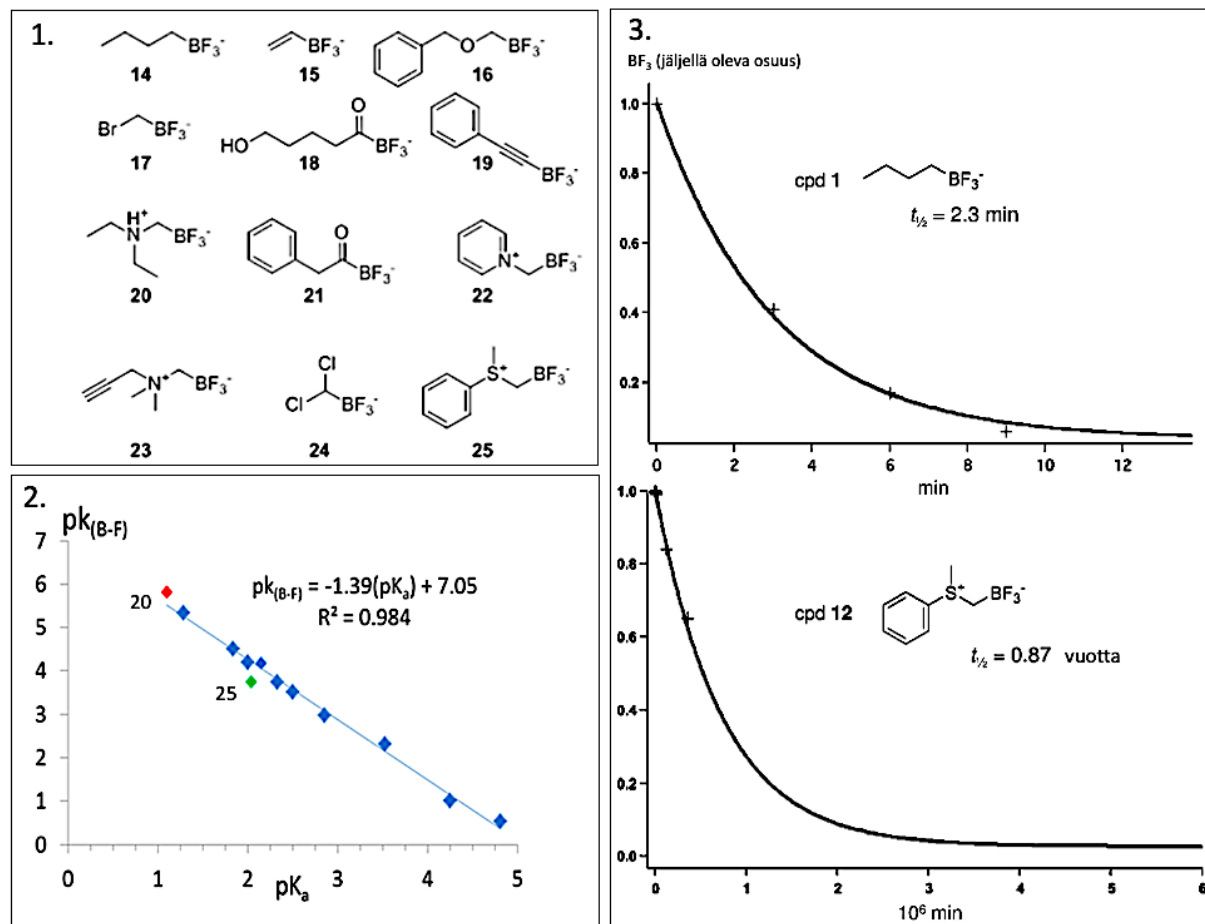
2. Trifluoriboraattianionin solvolyyisin mekanismi:



Kuva 12. (1) Trifluoriboraatin muodostumisen reaktiomekanismin tarkastelu. Relatiiviset stabiilisuudet intermediateilla 2a, 3, 4, 4a ja 5 ovat tuntemattomia. Reaktionuolien suhteelliset pituudet viittaavat yhdisteiden stabiilisuuteen: elektronivajaat boraanit eivät ole niin stabiileja kuin boraatit. (2) Trifluoriboraatin solvolyyysi.⁷⁸

Korkeasta sidosenergiasta johtuen boori- ja fluoriatomin välillä [¹⁸F]organotrifluoriboraattien suolat ovat hydrolyyttiselta stabiilisuudeltaan heikkoja alle 7 pH:ssa ellei niitä stabilisoida sopivilla substituentteilla muun molekyyliarakenteen sisällä.⁶ Perrin tutkimusryhmineen on tutkinut eri trifluoriboraattiprekursorien solvolyyysia ja reaktiokinetiikkaa useassa eri tutkimusartikkelissa tavoitteena tarkastella fluorausreaktion mekanismia ja in vivo kineettistä stabiilisuutta (Kuva 12).^{78,80,81} Kineettistä stabiilisuutta seurattiin ¹⁹F-NMR-spektroskopian avulla aryyli-trifluoriboraatin sarjanäytteillä pH:ssa 7.⁸⁰ He huomasivat kuitenkin, että aryyli-trifluoriboraatit solvolyysoituvat nopeasti: esimerkiksi p-aminosulfonyyli-fenyylitri-fluoriboraatti solvolyyysin puoliintumisaika on 22 minuuttia p-aniilitri-fluoriboraatin solvolyysoituessa sekoituksen aikana. Solvolyyysi seuraa pseudo 1. kertaluvun reaktion kinetiikkaa. Kuvan 12 intermediaatteja 2-5 ei kuitenkaan havaittu ¹⁹F-NMR-spektroskopiatuskimuksessa, mikä on selitettävissä niiden ennustetun epästabiilisuuden nojalla pH:ssa 7. Tällä löydöksellä oli tärkeä seuraus radiosynteesille, sillä ainoastaan [¹⁸F]ArBF₃ pystyttiin erottamaan. Solvolyyysi takaisin aryyliboorihapoksi ja vapaaksi fluoriksi ei ole suotuisaa PET-kuvantamisessa, sillä [¹⁸F]fluoridi kerääntyy luihin ja häiritsee kuvantamista.⁶ Kineettisesti stabiili aryyli-trifluoriboraatti voitiin kuitenkin muodostaa oikealla modifikaatiolla molekyyliarakenteen sisällä. Hammetin analyysin jälkeen havaittiin, että elektroneja puoleensa vetävät ryhmät (EWG, engl. electron-withdrawing groups), erityisesti aromaattisen renkaan orto-asemassa booriatomiin nähden, hidastavat solvolyyysin nopeutta.⁸⁰ Elektroneja luovuttavilla substituentteilla oli vastakkainen vaikutus tähän. Substituenttien induktiiviset efektit vaikuttavat B-F-sidoksen polarisoituvuuteen ja

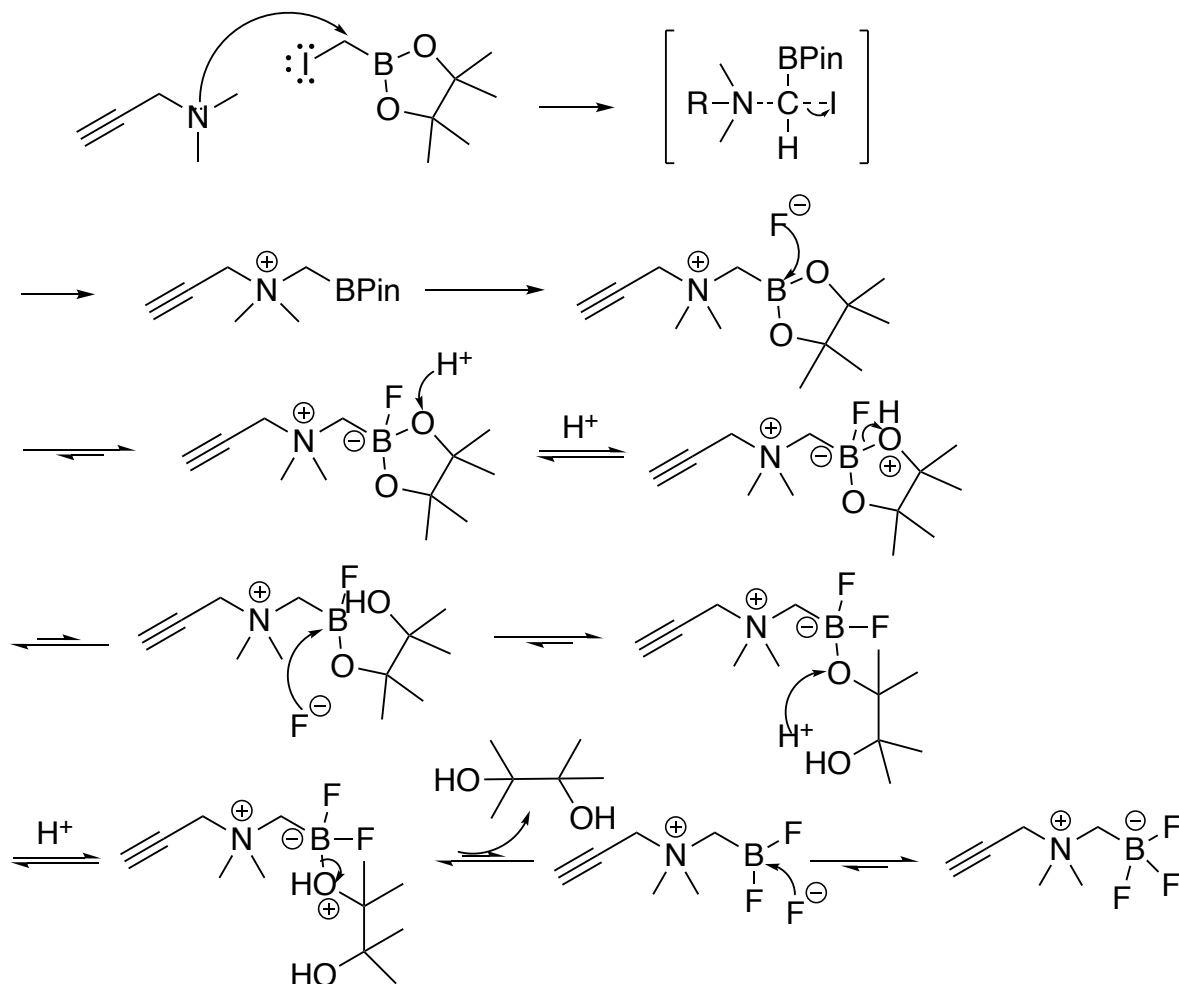
sitä kautta säätävät sidoksen herkkyyttä hydrolyyttiselle hyökkäykselle. Aromaattisesta substituentista riippuen solvolyyysin reaktionopeudet voivat vaihdella hyvin nopeasta ($k_{\text{obs}} \approx 0,3 \text{ min}^{-1}$)¹⁾ hitaaseen ($k_{\text{obs}} \approx 10^{-4} \text{ min}^{-1}$).



Kuva 13. (1) Solvolyyysikokeissa tutkitut ei-aromaattiset orgatrifluoriboraattiprekursorit. (2) Korrelaatio trifluoriboraattien $pK_{\text{B-F}}$ - ja vastaavien karboksyylihappojen pK_a -arvojen välillä. Yhdisteiden 20 ja 25 on merkitty kuvaajaan erikseen oikein pisteiden kohdalle. (3) Ensimmäisen kertaluvun reaktiokinetiikkaa vastaava solvolyyysi yhdisteistä 14 ja 25 ^{19}F -NMR-spektrokopiolla määritettynä.⁸¹

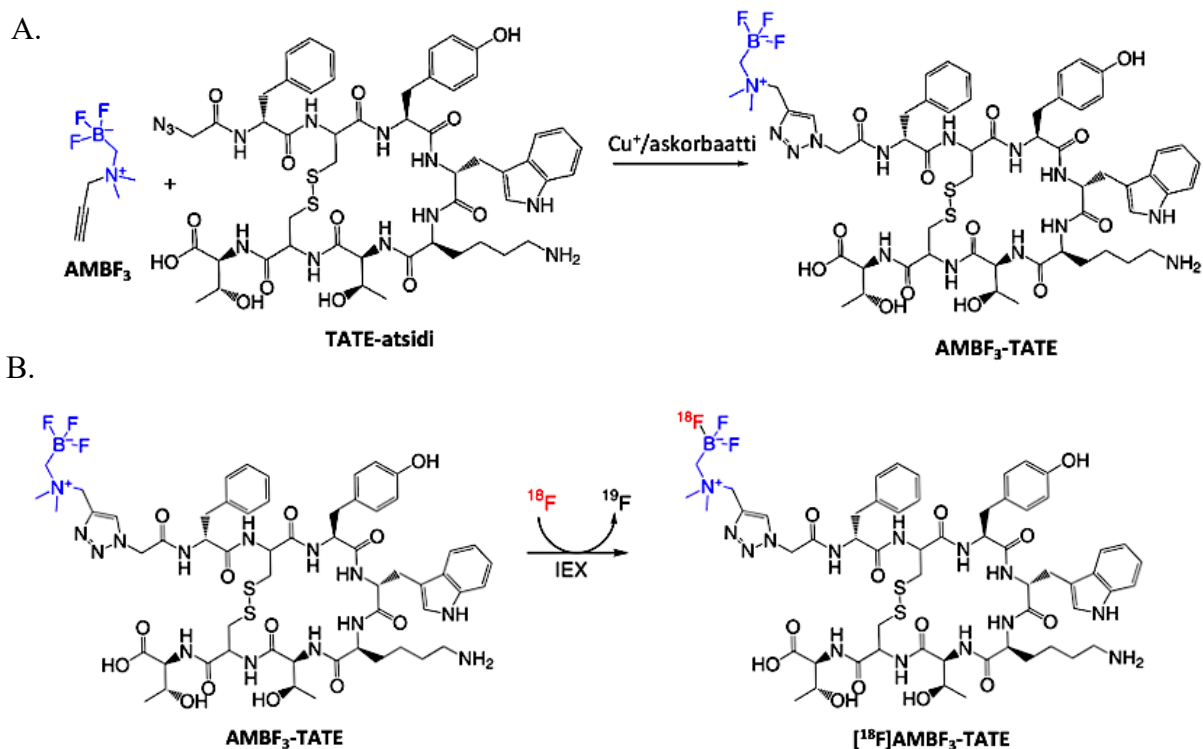
Vaikka sp^2 -hybridisoituneen hiiliatomin hyödyntäminen aromaattisessa renkaassa on yleistä radiolääkeaineiden kehityksessä, Perrinin tutkimusryhmä laajensi solvolyyysikokeita ei-aromaattisiin organotrifluoriboraattiprekursoreihin (Kuva 13, 1 ja 2).⁸¹ He huomasivat yhtäläisyyden solvolyyttisen reaktionopeusvakioiden negatiivisen logaritmiarvon ($pK_{\text{B-F}}$) ja trifluoriboraattia vastaavan karboksyylihapon pK_a -arvon välillä. Jos yhtäläisyydet olisivat yleistettävissä, tällöin näiden trifluoriboraattien vastatessa solvolyyysivakioltaan niiden ($pK_a < 2,5$) vastinkarboksyylihapon pK_a -arvoa pitäisi trifluoriboraattiprekursorin olla kineettisesti stabiili *in vivo* käyttöön. Tämän hypoteesin he osoittivat 12 eri organotrifluoriboraattimolekyylillä. Yksi näistä prekursoreista on

[^{18}F]alkyyliammonium-metyylitrifluoriboraatti ([^{18}F]AMBF₃ eli [^{18}F]1), joka on olennainen myös tämän tutkielman kokeellisen osuuden kannalta. Sitä vastaavan karboksyylihapon, betaiinin pK_a on 1,84 ja AMBF₃:lla on alhainen defluorinaation nopeusvakio (k_{obs}) $3,13 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$. Tämä radiosyntoni on osoittautunut hyvin stabiiliksi defluorinaatiota vastaan sekä *in vitro* että *in vivo*.^{76,82–87}



Kuva 14. AMBF₃:n reaktiomekanismi nukleofiilinen substituutio ja fluoraus. Reaktiomekanismi piirrettiin Kuvan 12 kohdan 1 perusteella.

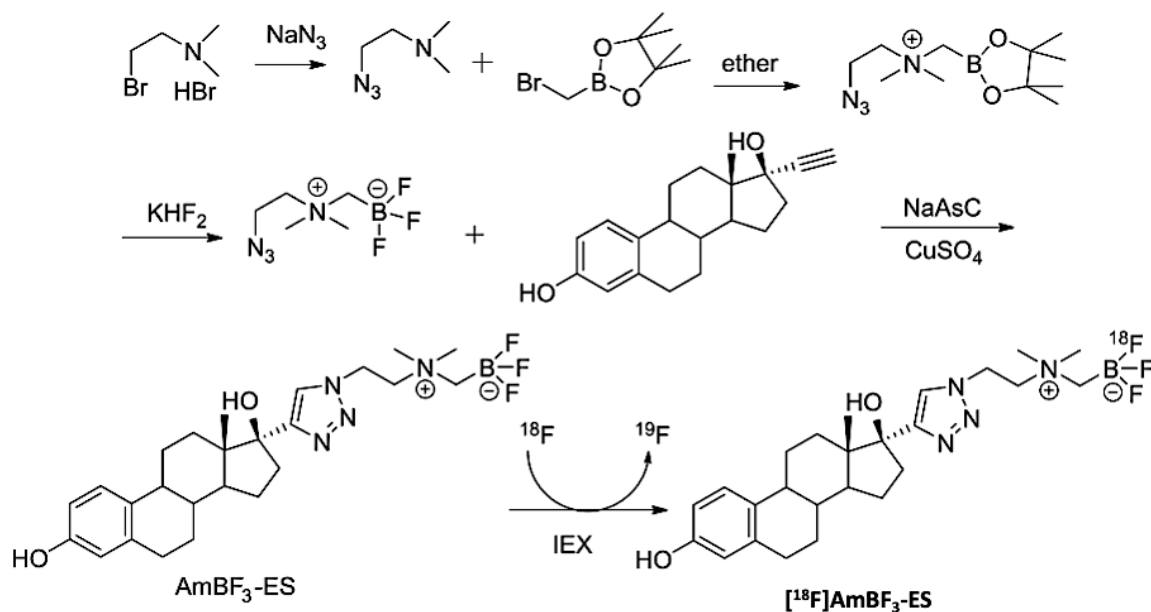
AMBF₃:n syntetisoidaan nopeasti ja helposti kaksivaiheisen synteessin avulla (Kuva 14).^{82,83,86,88,89} Ensimmäisessä vaiheessa muodostetaan välituotteena booripinakoliesteri nukleofiilisen S₂N-substituution kautta ja viimeisessä vaiheessa booriatomi fluorataan happamassa 4 M kaliumbifluoridin vesiseoksessa. Vesiliuoksessa bifluoridi-ioni esiintyy fluoridi- ja oksoniumionina. Fluoridi sitoutuu booriatomiin, jolloin muodostuneen tetrafluoriboraatti-ionin ulkoinen varaus on -1. Happamissa pinakoliesteri hydrolysoituu pinakoliksi ja eliminoiduu molekyylistä, kun kaksi fluoridi-onia sitoutuu kovalenttisesti booriin eri vaiheissa. Trifluoriboraatit ovat stabiileja yhdisteitä, sillä ne kestävät hyvin huoneilmaa ja kosteutta.^{90,91} Ne ovat kuitenkin kemiallisesti reaktiivisia.



Kuva 15. (A) AMBF_3 ja TATE-atsidin kupari-katalysoitu klik-reaktio. (B) $\text{AMBF}_3\text{-TATE}$ radiofluorauus ^{19}F - ^{18}F isotooppisella vaihdosreaktiolla.⁸²

Yhden vaiheen ^{18}F -leimausmenetelmää, joka soveltuisi monipuolisesti erilaisille peptideille, on yritetty kehittää pitkään.^{83,92–95} Biomolekyylejä, kuten peptidejä, proteiineja ja oligonukleotideja käytetään molekulaarisessa kuvantamisessa merkkiaineina, koska ne ovat kohdespesifejä. Ne eivät kuitenkaan kestä normaaleja radiofluorauusreaktioissa käytettyjä olosuhteita, mutta siitä huolimatta muutamia onnistumisia on saavutettu. Biologisesti aktiivisten molekyylien ^{18}F -radioleimaus voidaan tehdä joko suoraan biomolekyyliin tai epäsuorasti proteettisen ryhmän radioleimauksen kautta rinnakkaisella biokonjugaatiolla biomolekyylin ja radioleimatun proteettisen ryhmän välillä. Perrinin tutkimusryhmän 2015 julkaisemassa protokollassa suoraa peptidin radioleimausta hyödynnetään $[^{18}\text{F}]\text{AMBF}_3\text{-TATE}$ radiofluorauksessa (Kuva 15).⁸² Ennen radiosynteesiä AMBF_3 konjugoidaan kupari-katalysoidun klik-reaktion kautta TATE-atsidiin, minkä jälkeen seuraa suora radioleimaus ^{19}F - ^{18}F isotooppisella vaihtoreaktiolla 25-30 % RCY:llä. $[^{18}\text{F}]\text{AMBF}_3\text{-TATE}$, okreotidijohdannaisen käyttöä on arvioitu prekliinisesti neuroendokriinisten, erityisesti somatostatiinireseptori alatyypin 2 (sstr2) ilmaisevien, kasvainten kuvantamisessa.⁸⁶ Isotooppisen vaihdosreaktion avulla merkkiaineen puhdistus voidaan tehdä ioninvaihtohartseilla, jolloin isotöistä HPLC-puhdistusta ei tarvita (High performance liquid chromatography = Korkean erotuskyvyn nestekromatografia). Lisäksi muita organotrifluoriboraatti-peptidimerkkiaineita on radioleimattu $[^{18}\text{F}]\text{AMBF}_3\text{-TATE}$:n tavoin. $[^{18}\text{F}]1$ prekursoria on myös konjugoitu muihin peptideihin, kuten

okreotaatin johdannaiseen⁸⁶, bombesiiniin⁸⁵, bradykiniiniin⁹⁶ ja rhodamiini-RGD-dimeeriin^{87,97}. Lisäksi trifluoriboraattifunktionaalisuutta on hyödynnetty [¹⁸F]AMBF₃-ES:n⁸⁸ radioleimauksessa, jossa AMBF₃-atsidi biokonjugoitiin estradiolijohdannaiseen, joka radioleimattiin edelleen IEX:llä (Kuva 16).



Kuva 16. AMBF₃-ES orgaaninen synteesi ja ¹⁸F-AMBF₃-ES radiosynteesi.⁸⁸

Organotrifluoriboraatteja voi biomolekyyleihin konjugoinnin lisäksi liittää pienempiin molekyyleihin. Isotooppista leimausta on hyödynnetty [¹⁸F]-N-heterosykli-karbeeni-BF₃:n radioleimauksessa.⁹⁸ Tämä merkkiaine konjugoitiin edelleen useisiin eri peptideihin. Lisäksi radiofluorausmetodia on käytetty sulfonamidi-pohjaisten inhibiittoreihin, joita voidaan hyödyntää hypoksian diagnostiikassa PET-kuvantamisessa.⁹⁹ [¹⁸F]- α -amiinialkyyli-BF₃ soluun sisäänottoa on havaittu aminohapotransporttereita ilmentävissä syöpäsoluissa.¹⁰⁰ Tämä mahdollistaisi [¹⁸F]fluoriboraattien käytön radiolääkeaineena PET-kuvantamisessa [¹⁸F]FDG:n ja [¹⁸F]MISO:n rinnalla.

[¹⁸F]Fluoriboraatit eivät ole vielä kliinisessä käytössä PET-kuvantamisessa, sillä niiden toksisuustutkimukset ovat vielä kesken.⁷⁸ Trifluoriboraatit eivät ole toksisia, mutta biokonjugoidun trifluoriboraatin toksisuudesta ei voida siltikään olla varmoja. Siksi korkea MA on tärkeä, sillä se laskee annosteltavan radiolääkeaineen molaarista määrää. Kahtaisionirakenteen ansiosta arvioidaan, että amiinirakenteet omaavat radiolääkeaineet voisivat läpäistä veriaivoesteen neurologisissa PET-

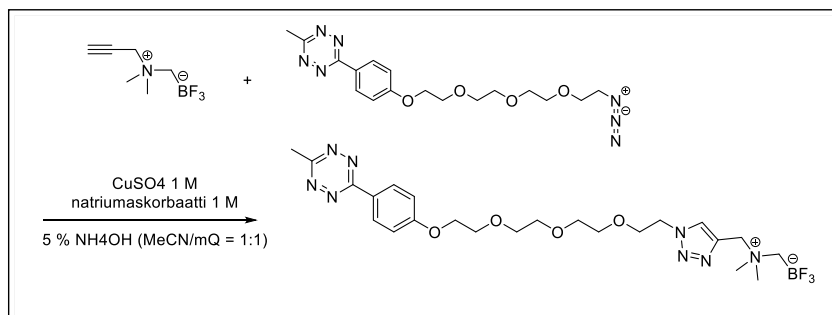
kuvauksissa. Radioleimausmetodin pitäisi myös sopia multimodaaliseen kuvantamiseen mihin tahansa molekyyliin liitettynä ^{99m}Tc -kelaattiin, kuten vasta-aineet, nanopartikkeleisiin, aptameereihin, peptideihin ja glykosideihin. Kahtaisionisen trifluoriboraattiprekursorin uskotaan tarjoavan myös hyötyä teranostiikassa boori neutronin-kaappausterapiaan (BNCT, engl. boron neutron-capture therapy).

2.8 Bio-ortogonaaliset reaktiot ^{18}F -radioleimauksissa

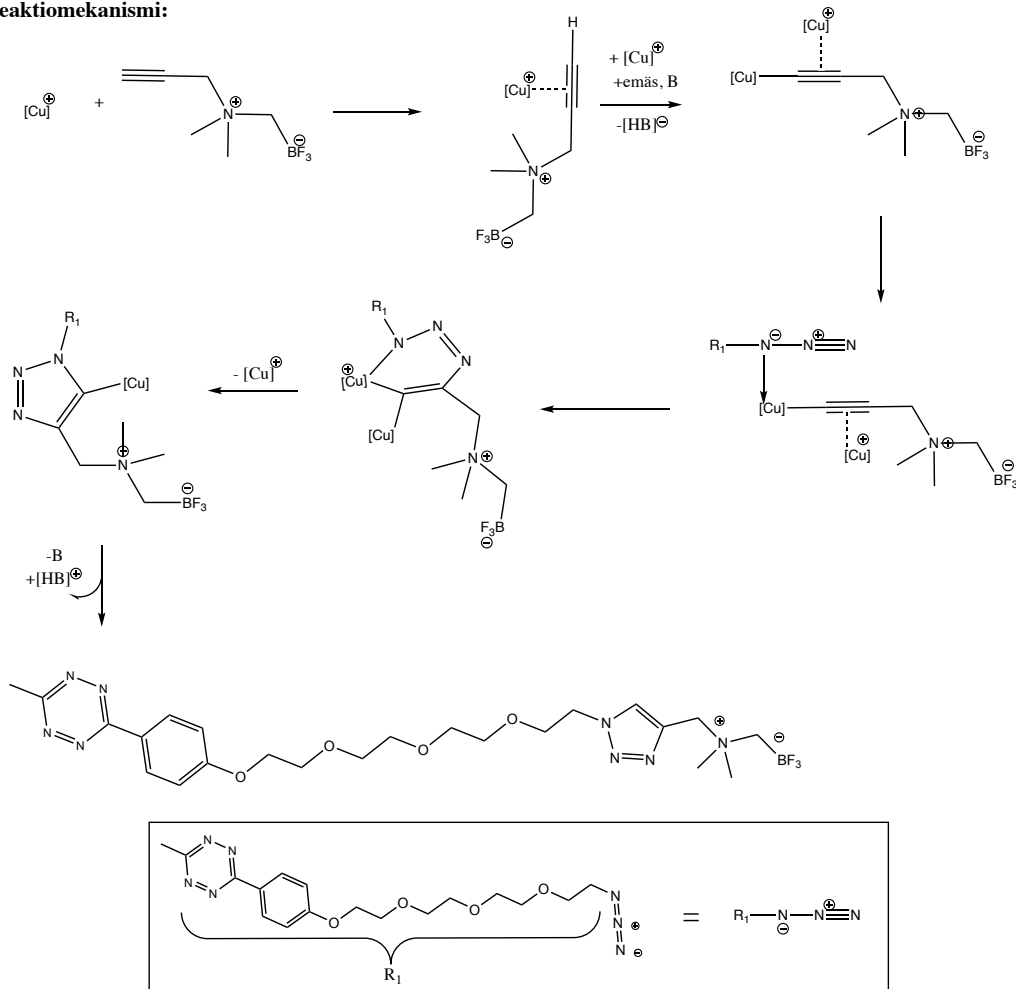
Yksi tapa liittää prosteettisia ryhmiä biomolekyyliin perustuu klik-kemiaan. Tähän perustuvat menetelmät voidaan jakaa kolmeen ryhmään: Kupari(I)-katalysoidut atsidi-alksykloadditiot¹⁰¹, molekyylin rakenteen sisäisen jännitteen edistämä [3+2] atsidi-alkyynisykloadditiot¹⁰² (SPAAC, engl. strain-promoted alkyne-azide cycloaddition), Straudinger-¹⁰³ ja tetratsiiniligaatit¹⁰⁴. Tyypillisesti klik-reaktioon perustuva radioleimaus on kolmivaiheinen: prosteettinen ryhmä radioleimataan kovissa reaktio-olosuhteissa, radioleimatun ryhmän puhdistus ja lopuksi konjugaatio-reaktio kohdemolekyylin miedoissa olosuhteissa. Radioleimausprotokollan pitäisi olla mahdollisimman nopea, jotta radionuklidi ei ehdi puoliintua. Nykyiset menetelmät vaativat kuitenkin useamman aikaa vievän toimintavaiheen. Lisäksi pienet prosteettiset ryhmät saattavat vaikuttaa biomolekyylin reseptorisitoutumisominaisuuksiin ja biologiseen käyttäytymiseen, mitkä on otettava huomioon radiolääkeainekehityksessä.

Kuuluisin ja jo pitkään laajalti käytetty klik-reaktio on Huisgen 1,3-dipolaarinen sykloadditio, jossa atsidi ja alkyyni reagoivat keskenään muodostaen triatsolin.^{105–107} Reaktioon liittyy kuitenkin muutamia rajoituksia, sillä se vaatii korkeat lämpötilat ja paineet. Lisäksi reaktio ei ole regioselektiivinen vaan johtaa 1,4- ja 1,5-substituoitujen triatsolien seosten muodostumiseen. Torn et. al. 2002 havaitsivat kupari(I)katalyyttien katalysoivan reaktiota tehokkaasti ilman lämmitystä muodostaen vain 1,4-substituoituja triatsoleja.¹⁰⁵ Kuparin käyttö reaktioissa johtaa kuitenkin useanlaisiin ongelmiin⁶. Kupari on toksinen ylittäessään tietyn maksimikonsentraation ja sen poistaminen kokonaan lopullisesta formuloidusta lopputuotteesta on erittäin tärkeää.

Synteesikaavio:



Reaktiomekanismi:

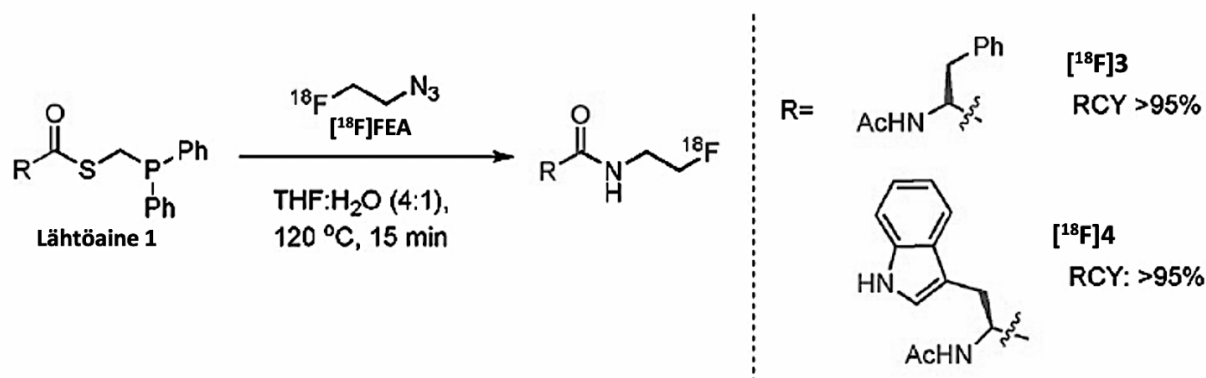


Kuva 17. AMBF₃-PEG₄-mTz:n synteesi ja kupari-katalysoidun alkyyni-atsidi sykloaddition (CuAAC) reaktiomekanismi.^{108,109} Tämä mekanismi perustuu Fokin tutkimusryhmän julkaisemiin tiheysfunktionaaliteorian laskutuloksiin CuAAC reaktiosta. Kuvassa [Cu] vastaa Cu(I)kompleksia yhteensopivien ligandien kanssa.

Tämän tutkielman kokeellisen osuuden toinen prekursori, AMBF₃-PEG₄-mTz muodostuu Huisgen sykloadditioreaktiossa (Kuva 17).^{108,109} Orgaaniset atsidit pystyvät reagoimaan niin nukleofiileina kuin elektrofiileina avaten pääsyn typpikemiaan tai dipoleina sykloadditioissa tukien niiden tärkeää roolia synteettisessä kemiassa.¹¹⁰ Kupari(I)-katalysoidut atsidi-alkyyni sykloadditiot (CuAAC, engl.

Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition) reaktioita käytetään esimerkiksi paljon lääkeainekemiassa, polymeeritieteessä ja kemiallisessa biologiassa.¹¹¹

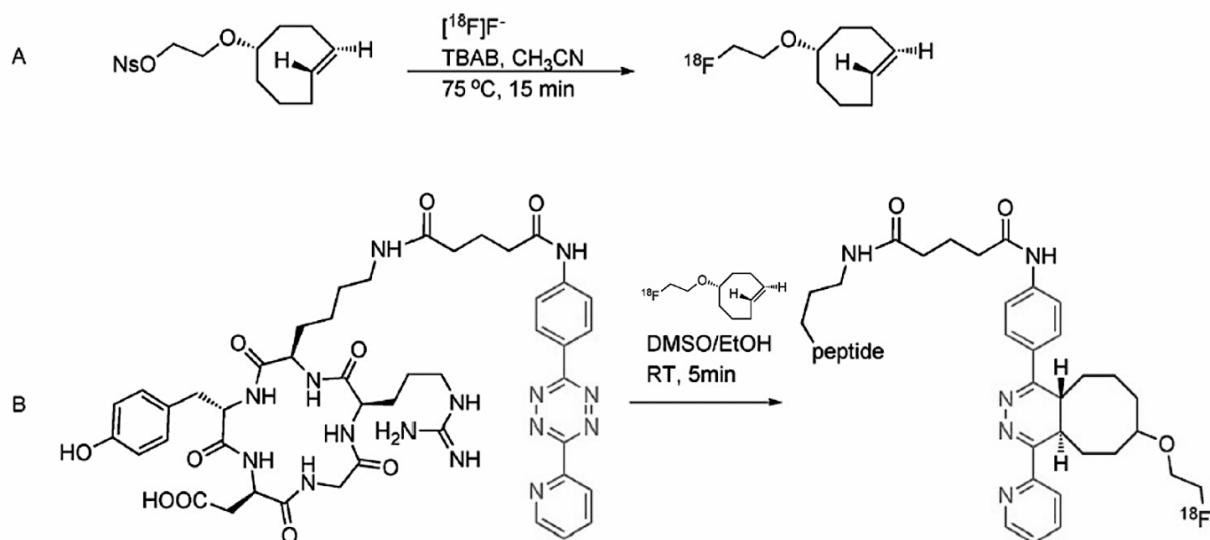
Cu(I)katalyyttien käytön välttäminen johti uuden klik-reaktiomenetelmän kehittämiseen, jossa jännittynyt rengasrakenteinen molekyyli reagoi klik-reaktion kautta alkyynifunktionalisuuteen ilman katalyytin lisäystä.^{112–115} Steerinen jännite johtuu kahdesta alkyynin sp-hybridisoituneesta hiiliatomista. Tällaisten atomien sidoskulmat ovat 180°, kun taas syklo-oktyynin atomien sidoskulmat ovat lähempänä 163° luoden noin 18 kcal/mol suuruisen rengasjännitteen.¹¹⁶ Nämä jännitteen edesauttavat [3+2] atsidi-alkyynisykloadditioreaktiot (SPAAC) kuuluvat kupari-vapaisiin klik-reaktioihin. Niiden käyttö on yleistynyt uusien radiolääke- ja merkkiaineiden kehittämisessä molekulaariseen kuvantamiseen sekä kohdistettuun radioterapiaan.^{102,117} SPAAC reaktioillakin on kuitenkin rajoituksia. Merkittävin näistä rajoittavista tekijöistä ligaation kannalta on jännittyneen rengasrakenteisen sykloaklyynin ja klik-reaktiossa muodostuneen lopputuotteen hydrofobisuus, mikä vaikeuttaa radiosynteesiä. Tämän takia synteeseissä on käytettävä reagensseja, jotka helpottavat liukenemista. Kyseisiä reagensseja on kuitenkin vaikea erottaa lopputuotteesta ja lisäksi niillä on haitallisia vaikutuksia *in vivo* farmakokinetiikkaan sekä radiolääkeaineen farmakodynaamiseen profiiliin.¹¹⁸



Kuva 18. Aminohappojohdannaisen ^{18}F -radioleimaus diaryylifosfiini-pohjaisista tioliestereistä.¹¹⁹

Straudingerin ligaatiossa atsidi ja fosfiini reagoivat muodostaen imiinifosforaanin tai atsoylidin, joka nopeasti hydrolysoituu tuottaen primaarisen amiinin ja vastaavan fosfiinioksidin. Reaktio tapahtuu nopeasti huoneenlämmössä korkein reaktiosaannoin.^{120,121} Toistaiseksi on raportoitu vain yksi sovellutus biomolekyylin ^{18}F -radioleimauksessa hyödyntäen Straudingerin ligaatiomenetelmää. ^{18}F FDG:n johdannaisia on valmistettu PET-kuvantamiseen ^{18}F -radioleimatun fosfaatin, atsidin ja sokerin tai aminohapon välisessä reaktiossa.¹²² Toista yleistä prosteettista ryhmää, 2- ^{18}F fluorietyyliatsidia (^{18}F FEA) (Kuva 18), käytettiin atsidikomponenttina Carroll et al.¹¹⁹ toimesta vastaavanlaisessa Straudingerin ligaatiosovellutuksessa. He yhdistivät eli funktionalisoivat useita

aminohappojohdannaisia diaryylifosfiini-substituoituihin tioliestereihin (Kuva 18, Lähtöaine 1), joiden vastaavat radiomerkkiaineet saatiin tuotettua korkealla radiokemiallisella saannolla (Kuva 18, [^{18}F]3 ja [^{18}F]4). Vaikka Straudingerin ligaatio ei vaadi metallikatalyyttiä ja lopputuotteena muodostuneet merkkiaineet voidaan helposti puhdistaa, reaktiomenetelmän käyttöä rajoittaa kuitenkin reaktiokinetiikan hitaus ($20 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹²³.



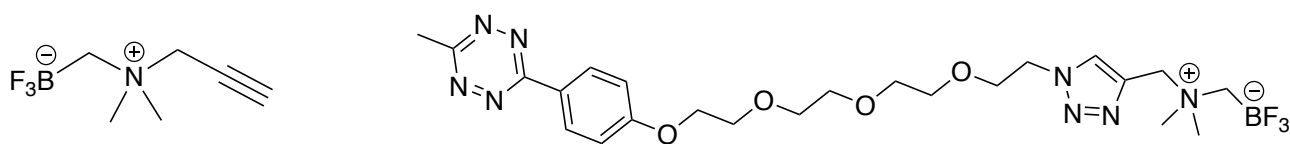
Kuva 19. (A) Fluori-18 radioleimatus TCO:n radiosynteesi. (B) Syklisen RGD-peptidin ^{18}F -radioleimaus tetratsiiniligaation välityksellä.^{124–126}

Rakenteeltaan jännittyneiden alkeenien, kuten trans-syklo-okteenien (TCO), syklo-oktyynin ja noborneenin, sekä 1,2,4,5-tetratsiinien väliselle Diels-Alder sykloadditiolle (IEDDA, engl. inverse-electron-demand Diels-Alder cycloaddition) on löydetty paljon sovellutuksia bio-ortogonaalisena reaktiona.^{104,127} Tetratsiinijohdannaisten IEDDA reaktio omaa nopeimman tunnetun reaktiokinetiikan ($k_2 = 2000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ metanoli:vesi-liuoksessa 9:1) ilman metallikatalyyttiä bio-ortogonaalisen kemian piirissä. Reaktio on tulevaisuudessa tuottoisa kandidaatti lyhytikäisillä radionuklideilla leimattujen radiolääkeaineiden tuotannossa *in vivo* kuvantamiseen. Fox et al. 2010 ovat havainnollistaneet tämän biokonjugaation hyödyllisyyttä biomolekyylien ^{18}F -radioleimauksessa TCO:lla (Kuva 19, A) ja syklisellä RGD-peptidillä (Kuva 19, B).^{124–126} Toistaiseksi tetratsiinin käyttöä IEDDA reaktiossa fluori-18 radioleimauksessa on tutkittu modifioitujen monoklonaalisten vasta-aineiden radioleimauksessa spesifiseen kohteen paikantamiseen kuvantamisessa.^{128,129} Reaktion käyttöä on rajoittanut lopputuotteen isomerisoituminen, joka johtaa ei-haluttujen sivutuotteiden muodostumiseen. Aikaisemmin tetratsiineja on leimattu onnistuneesti ^{64}Cu ja ^{111}In esikohdennettuun *in vivo* kuvantamiseen kasvainspesifisillä monoklonaalisilla vasta-aineilla.^{130–132}

3 Tutkimusosuus

3.1 Työn tausta ja tarkoitus

Tutkielmatyön tarkoituksena oli optimoida trifluoriboraattifunktionaalisuuden omaaville prosteettisille ryhmille automatisoitu radiosynteesi, jonka käyttö on välttämätön kliinisen tason radio-lääkevalmistuksessa (GMP, Good Manufacturing Practise). Boori- ja fluoriatomin välinen kovalenttisen sidoksen hyödyntäminen on kasvattanut suosiota radiofluorausreaktioissa erityisesti biokonjugaation yhteydessä peptideihin tai muihin makromolekyyleihin, jotka eivät kestä nukleofiilisen radiofluorauksen ääriolosuhteita.⁸² Trifluoriboraattien radioleimauksessa isotooppinen vaihdos ei vaadi vedettämiä olosuhteita eikä sisällä pH-olosuhteiden muutoksia. Tähän työhön radioleimauksen optimointiin valittiin Perrinin tutkimusryhmän julkaisema^{76,82,133} kahtaisioninen prosteettinen ryhmä, N-propargyyli-N,N-dimetyyliammoniummetyylitrifluoriboraatti (**AMBF₃**), ja toiseksi merkkiaineeksi **AMBF₃**:n klik-konjugoitu **AMBF₃-PEG₄-mTz**, ((dimetyyli((1-(2-(2-(2-(2-(4-(6-metyyli-1,2,4,5-tetratsin-3-yyli)fenoksi)etoksi)etoksi)etoksi)etyyli)-1*H*-1,2,3-triats-4-yyli)metyyli)ammonium)metyyli)trifluoriboraatti. Merkkiaineiden rakenteet on esitetty kuvassa 20.

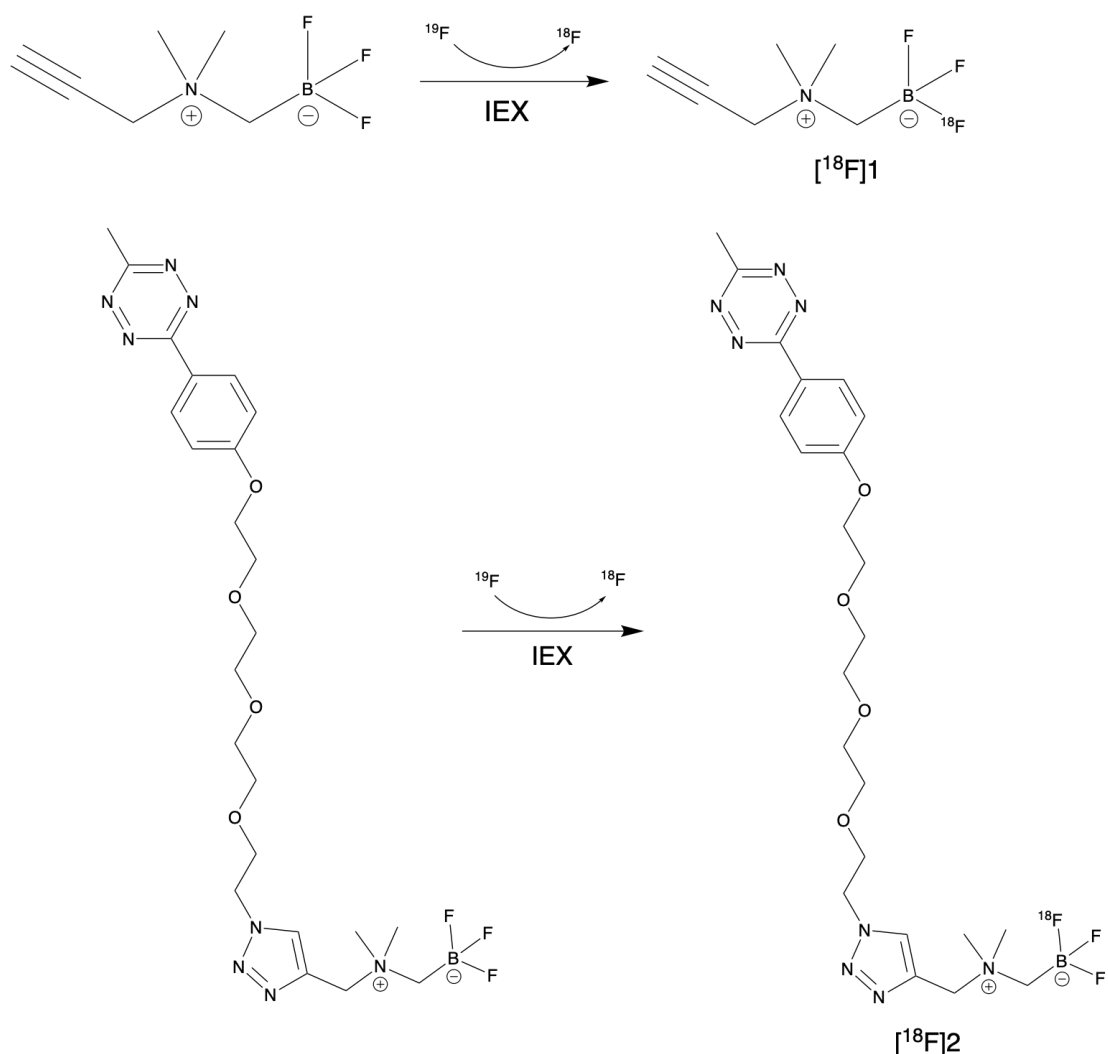


Kuva 20. Vasemmalla N-propargyyli-N,N-dimetyyliammoniummetyylitrifluoriboraatin (**AMBF₃**) ja oikealla ((dimetyyli((1-(2-(2-(2-(2-(4-(6-metyyli-1,2,4,5-tetratsin-3-yyli)fenoksi)etoksi)etoksi)etoksi)etyyli)-1*H*-1,2,3-triats-4-yyli)metyyli)ammonium)metyyli)trifluoriboraatti (**AMBF₃-PEG₄-mTz**).

Prosteettisena ryhmänä **AMBF₃**:n soveltuvuus radiofluoraukseen mahdollistaa biokonjugaation laajasti eri peptideihin ja uusien kohdespesifisten merkkiaineiden tarjonnan molekulaarisessa kuvantamisessa. **AMBF₃-PEG₄-mTz** prosteettisena ryhmänä puolestaan tuo lisää mahdollisuuksia liittää trifluoriboraattiprekursoreita peptideihin trans-syklo-okteenien (TCO) ja tetratsiinien välisen Diels-Alder sykloaddition (IEDDA, engl. inverse-electron-demand Dies-Alder cycloaddition) kautta.^{128,129}

AMBF₃ syntetisoitiin kaupallisilla reagensseilla kahden synteesivaiheen kautta soveltaen Perrinin tutkimusryhmän julkaisemaa synteesiä.^{76,82,86} Kupari-katalysoidussa klik-konjugaatiossa käytettiin syntetisoidun **AMBF₃** lisäksi kaupallisesti saatavilla olevaa PEG₄-atsidi-mTz:a, joista syntetisoitiin **AMBF₃-PEG₄-mTz** soveltaen Z. Liun väitöskirjassa¹³³ julkaistua prekursorin **AMBF₃-PEG₄-NH-**

mTz synteesiä. Isotooppinen vaihtoreaktio (Kuva 21) radiofluorauksessa ei ole yhtä yleisesti käytössä oleva metodi kuin nukleofiilinen radiofluorauus lääketieteessä, jonka on todettu johtavan parempiin radiokemiallisiin saantoihin vedettömissä olosuhteissa eikä IEX reaktioissa ole stabiilin fluori-19 takia odotettavissa korkeaa molaarista aktiivisuutta. [^{18}F]Fluoridi ei ole reaktiivinen vesimolekyylien ympäröimänä eli hydratoituneena. Aktiivisuus on saatava erotettua kohtiovedestä eluoimalla anioninvaihtopatruunaan (μQMA) pidähtynyt [^{18}F]fluoridi mahdollisimman pieneen tilavuuteen suurella aktiivisuuskonsentraatiolla. Kuumalaboratorioon tämä radiosynteesin automatisointi vaatii optimointia ja riittäviä toimenpiteitä, jotta radioleimauksesta saadaan mahdollisimman säteilyturvallinen.



Kuva 21. N-propargyyli-N,N-dimetyyliammoniummetyylitrifluoriboraatin (AMBF_3) ja ((dimetyyli((1-(2-(2-(2-(2-(4-(6-metyyli-1,2,4,5-tetratsin-3-yyli)fenoksi)etoksi)etoksi)etyyli)-1H-1,2,3-triats-4-yyli)metyyli)ammonium)metyyli)trifluoriboraatin ($\text{AMBF}_3\text{-PEG}_4\text{-mTz}$) ^{18}F -radioleimaus isotooppisen vaihdosreaktion kautta.

Radioleimauksissa optimoitiin uudet radioleimausolosuhteet ja radiokemiallisen puhtauden määrittämenetelmät, jotka poikkesivat hieman Perrinin tutkimusryhmän julkaisemista olosuhteista.⁸² Radiokemiallista saantoa voidaan parantaa IEX reaktiossa pienentämällä reaktion kokonaisuus-tilavuutta ja käyttämällä mahdollisimman konsentroitua prekursoriliuosta (Kuva 21). Näihin tekijöihin kiinnitettiin erityistä huomiota radioleimauksen optimoinnissa.

Tutkimusosuus tässä maisterintutkielmassa jakaantuu prekursorien orgaaniseen synteesiin, syntetisoitujen lopputuotteiden karakterisointiin ja radiosynteesien optimointiin. Osiossa 3.2 esitetään tutkimuksessa käytetyt analyysi- ja instrumenttilaitteet, välineet, kemikaalit ja tarvittavien liuosten valmistus. Orgaanisista synteeseistä ja syntetisoitujen lopputuotteiden karakterisointi esitetään osiossa 3.3. Radiosynteseihin liittyviin radioleimausoptimointeihin keskitytään osiossa 3.4 ja 3.5. Merkkiaineiden lipofiilisyysskokeet esitetään osiossa 3.6. Tulokset osiossa edetään vastaavassa järjestyksessä.

3.2 Menetelmät ja materiaalit

3.2.1 Laitteet ja tarvikkeet

Merkkiaineiden karakterisoinnissa ennen radioleimausta käytettiin pitkälti 1D NMR:ää eli ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa (Bruker 400 MHz). Näytteet liuotettiin noin 1-5 mg/ml konsentraatiolla sopivaan deuteroituun NMR-liuottimeen ja siirrettiin puhtaalla neulalla ja ruiskulle borosilikaattilasista valmistettuun NMR-putkeen.

Orgaanisissa synteeseissä käytettyjen korkean kiehumispisteen liuottimien, kuten DMF:n (dimetyyli-formamidin), haihdutuksessa käytettiin haihdutuslaitetta Biotage V-10 Evaporator (Uppsala, Ruotsi).

Lopputuotteiden niin radio- kuin ei-radioleimattujen puhdistuksessa käytettiin erilaisia SPE-patruunoita. Watersin Sep-Pak patruunoista käytettiin Plus Alumina N- ja Silica-patruunaa sekä Light C18-patruunaa.

[¹⁸F]Fluoridi tuotettiin IBA 10/5 D2-syklotronilla (Ion Beam Applications, Louvain-La-Neuve, Belgia). Syklotroni koostuu elektromagneettisesta kentästä, kahdesta puolilympyrän muotoisesta elektrodista (esimerkiksi kuparielektrodi) sekä negatiivisia ioneja tuottavasta ionilähteestä. Syklotronin koko rakenne pidetään vakuuissa. Elektrodien väliseen kapeaan rakoon on asetettu vaihtovirta oskillaattorilla. Ionilähde ionisoi vetykaasua negatiivisiksi vetyioneiksi (⁻H), jotka

kiihtyvät kohti elektrodia, jolla on positiivinen potentiaali. Ionien liike-energia kasvaa jokaisella kierroksella niiden ohittaessa kohtioiden välisen raon, jolloin myös vaihtovirran suunta muuttuu. Magneettikentän vaikutuksesta hiukkasten liikerata taipuu spiraalin muotoiseksi. Kun hiukkaset ovat saavuttaneet halutun liike-energian, tuotettu negatiivinen hiukkassuihku muunnetaan positiiviseksi ohuen hiilikalvon avulla.^{134,135} Tarpeeksi korkeaenergisillä hiukkasilla voidaan pommittaa kohtion materiaalia. Tässä työssä kohtion materiaalina käytettiin ¹⁸O-rikastettua vettä (>97 %, IASON GmbH), jota pommitettiin protoneilla muodostaen [¹⁸F]fluoridia ja neutroneja.

[¹⁸F]1 ja [¹⁸F]2 synteesissä käytettiin DM Automation-ohjausjärjestelmää ja DM Automation-synteesiyksikköä (Hot Cell 2). Reaktioseos ja reagenssit kuljetettiin synteesilaitteistossa argon-kaasun avulla synteesiyksikköön kiinnitettyjen kaksi- ja kolmitieventtiilein (Bürkert Fluid Control Systems) välillä. Fluori-18 leimausreaktioissa käytetty synteesilaitteisto oli sijoitettu lyijykaapin sisälle. Lyijykaappiin oli johdettu syklotronilta lyijysuojattu fluorilinja. Lisäksi synteesiyksikköön oli liitetty argon-linja, jonka kautta reagenssien kuljetukseen käytetty argon-kaasu johdettiin laitteistoon. Kaasuvirtausta säädettiin lyijykaapin ulkopuolisesta neulaventtiilistä ja synteesilaitteistosta johdettiin kaksi venttiililinjaa lyijykaapin ulkopuolelle, joiden avulla lisättiin synteesissä tarvittuja reagensseja ja liuottimia. Laitteistoon kuului kuusi detektoria, joilla seurattiin patruunoiden, reaktio- ja jäteastioiden suhteellista radioaktiivisuutta. Synteesilaitteistolla pystyi myös lyijykaapin ulkopuolelta säätämään reaktioastioiden lämpötilaa merkkiaineen radioleimausreaktiossa ja jäähdyttämään takaisin huoneenlämpötilaan. Näiden merkkiaineiden radioleimauksessa tarvittiin pääasiassa vain kaasuvirtausta, sillä reaktioastioina käytettiin tyyppisten kartiopohjaisten lasipullojen sijasta polypropyleenisentrifuugiputkia (15 ml), jotka lämmitettiin erillisellä lämpöhauteella (Taulukko 2) synteesilaitteiston lämmitysmekanismien sijasta. Kartiolasipulloja käytettiin ainoastaan R1-astian paikalla, johon kohtiovesi johdettiin syklotronilta ennen [¹⁸F]fluoridin konsentroitua. Lyijysuojattuun Hot Cell 2:n oli asennettu myös annoskalibraattori (Veenstra Instruments).

HPLC:tä käytettiin prekursorien karakterisoinnissa sekä radioaktiivisten merkkiaineiden laadunvarmistuksessa. Käytetty laitteisto oli SHIMADZU:n HPLC-yksikkö, johon oli liitetty Canberra:n säteilymittari. Näytteet laitettiin laitteiston automaattiseen näytteidenottajaan. Laite oli yhdistetty tietokoneeseen, johon asennetulla LC-solutions ohjelmalla säädettiin HPLC:n virtausnopeutta, eluenttien konsentraatiosuhdetta toisiinsa nähden, mitattavan näytteen määrää ja mittauksen kestoa. Mittauksissa käytettiin kolonnina Kinetex 5 µm C18 100 Å (250x10,0 mm) ja Alltima 5 µm C18 (250 x 4,6 mm).

AMBF₃-PEG₄-mTz:n reaktioseoksen karakterisoinnissa käytettiin kerran myös nestekromatografiaa yhdistettynä massaspektrometriin (LC-MS). Laitteiston osat UV- ja MS-detektorit mukaan lukien olivat Agilent Technolgicsin tuottamia. Kolonnina käytettiin Watersin Atlantis T3 3 µm (4,6x150 mm) kolonnia.

¹⁸F-leimattujen merkkiaineiden laadunvarmistusmenetelmänä HPLC:n ohella käytettiin radioaktiivisesta näytteestä ajettua TLC-levyä (Thin-Layer Chromatography= Ohutkerroskromatografia). Levyn analysoinnissa käytettiin FLA-5100 skanneria, jonka toimintaperiaate perustuu autoradiografiaan. Lopputuotteesta ajettu radioaktiivinen TLC-levy kuvannettiin erasoidulla PLS-kuvantamislevyllä (Photostimulated luminescence imaging plate = fotostimuloitu luminesenssi kuvantamislevy). Kuvantamislevyn BaFBr:Eu⁺² -kiteet virittyvät radioaktiivisen säteilyn vaikutuksesta. Radioaktiivisimmat pisteet TLC-levyllä aktivoituvat intensiivisimpinä pisteinä kuvantamislevylle. Levyjä pidettiin päällekkäin eli kuvantamislevyä viritettiin noin 2-5 minuuttia aktiivisuuden suuruudesta riippuen valotuskasetissa, minkä jälkeen kuvantamislevy skannattiin skannerilla. Skannauksen aikana laitteen punainen laseri (aallonpituus 633 nm) purkaa kuvantamislevyn virittyneet kohdat, jolloin kiteiden varaustilan purkautuessa skanneri detektoi niistä emittoituvia fotoneita (sinisen valuen aallonpituus, 390 nm). Skanneriin liitetyn tietokoneohjelman Image Reader FLA-500 Series V1.0-44 avulla rajattiin kuvantamislevyltä skannattu alue, minkä jälkeen saatu kuva analysoitiin Aida Image Analyzer V.4.00 -ohjelman avulla integroimalla tutkittavien alueet. Ohjelman avulla saatiin tietoa rajatun alueen suhteellisesta prosentuaalisesta radioaktiivisuusjakaumasta sekä reaktioseoksien komponenttien kulkema etäisyys levyllä, mistä voitiin edelleen laskea retentiotekijä (kaava 13, 3.2.4 Yhtälöt).

Lipofiilisyyden määrittämisessä käytettiin gammaspektrometriaa selvittämään prekursorien jakaantuminen eri faasien välillä niiden radioaktiivisuus jakauman perusteella. Gammailmaisimena käytettiin Wizard 3 automaattista gammailmaisinta PerkinElmeriltä. Muita kokeellisessa osuudessa käytettyjä tarvikkeita ja yksityiskohtaisempia tuotetietoja jo aiemmin mainituista materiaaleista on listattu taulukkoon 2.

Taulukko 2. Käytetyt laitteet ja laboratoriotarvikkeet.

Laite	Malli	Valmistaja
Syklotroni	Cyclone 10/5 D2	Ion Beam Applications
Automaattinen synteesiyksikkö		DM Automation
Annoskalibraattori	VDC 405	Veenstra Instruments
HPLC-ohjelmisto	LC-solution	Shimadzu
HPLC-ohjausyksikkö	CBM-20A	Shimadzu
HPLC-pumppu	LC-20AD	Shimadzu
HPLC-kolonne	Kinetex 5 µm C18 100 Å (250x10,0 mm) S/N: H18-154927 B/N 5701-0056	Phenomenex
HPLC-kolonne	Alltima 5 µm C18 (250 x 4,6 mm)	Hichrom
LC-MS-kolonne	Atlantis T3 3 µm (4,6x150 mm) Part No. 186003729 Lot No. 0124313421	Waters
Injektioruisku 1 ml	inject®	B.Braun
Injektioruisku 2 ml	Discardit TM II	BD
Injektioruisku 5 ml	Discardit TM II	BD
Injektioruisku 10 ml	Discardit TM II	BD
Injektioneula 1,2 x 40 mm	Microlance TM 3	BD
Injektioneula 0,4 x 19 mm	Microlance TM 3	BD
Injektioneula 0,7 x 40 mm	100 Sterican	B. Braun
Injektioneula 0,8 x 80 mm	101 Sterican	B. Braun
Pipetti 0,2-2 µl	Finnpipette	Biohit
Pipetti 0,5-10 µl	Proline Plus	Biohit
Pipetti 10–100 µl	Proline Plus	Sartorius
Pipetti 100–1000 µl	Proline Plus	Biohit
Silica-SPE patruuna	Sep-Pak®	Waters
C18-SPE patruuna	Sep-Pak®	Waters
Alumina N-SPE patruuna	Sep-Pak®	Waters
µ-QMA patruuna		MedChem Imaging
Reaktioastia ja korkki	Alltech	Grace Davison Discovery Science
Septumi reaktioastialle	20/400 PTFE/silikoni	Supelco
Sentrifugiputket Falcon, 15 ml (polyproyleeni)	525-0400	VWR
Kumisepta	Valkoinen, 14/20 liitos cat. no. Z553964	Sigma-Aldrich
Eppendorf putki, 5 ml	525-0794	VWR
Lämpöhaude (engl. Heating Block)	Thermomixer Comfort (15 ml sentrifugiputkille)	Eppendorf
Analyysivaaka	H110 Handy	Sartorius
TLC-levy	Silica gel 60 F254	Merck
FLA-kvantamislevy	BAS-TR2025	Fujifilm

3.2.2 Kemikaalit

Prosteettisten ryhmien orgaanisessa synteesissä käytetyt kemikaalit on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Orgaanisten synteesien kemikaalit

Kemikaali	Molekyylikaava	CAS numero	Tuotenumero	Laatu (%)	Tuottaja
Propargyyliamiini tai 3-Dimetyyliamiini-1-propyyini	C_5H_9N	7223-38-3	143065	97 %	Sigma-Aldrich
Jodimetyylibooripinakolaatti tai 2-(jodimetyyli)-4,4,5,5-tetrametyyli-1,3,3-dioksaborolaani	$C_6H_{12}BIO_2$	70557-99-2	EN300-244109	95 %	Enamine
Dietyylieetteri (vedetön)	$(C_2H_5)_2O$	60-29-7	346136 100 ml	$\geq 99,0$ %	Sigma-Aldrich
Dietyylieetteri	$(C_2H_5)_2O$	60-29-7	1009211000 1 l	Analyysilaatu	Supelco
Kloroformi- d_3 +TMS	$CDCl_3$	865-49-6	151823 100 ml	99,8 %	Sigma-Aldrich
Asetonitrili- d_3	CD_3CN	2206-26-0	151807 10+1.0 ml	99,8 %	Sigma-Aldrich
Suolahappo (37 %)	HCl	7647-01-0	320331 500 ml	Reagenssilaa tu	Sigma-Aldrich
Dimetyyliformamidi (vedetön)	$HCON(CH_3)_2$	68-12-2	227056 250 ml	99,8 %	Sigma-Aldrich
Kaliumbifluoridi, kide	KHF_2	7789-29-9	4E90253 1 kg	99 %	Riedel- De Haën Ag Seelze- Hannover
Kupari(II)sulfaatti, kide	$CuSO_4$	7758-98-7	C1297 100 G	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Ammoniakkiliuos (25 %)	NH_4OH	1336-21-6	16I134018 2,5 L	Analyysilaatu	VWR
Asetonitrili	CH_3CN	75-05-8	1126360050 50 ml	DNA-laatu (maks. 10 ppm H_2O)	Merck
mTz-PEG ₄ -atsidi, kiinteä	$C_{17}H_{23}N_7O_4$	N/A	CLK-1014N- 10 10 mg	> 95 %	Jena Biosciences
(+)-Natrium-(L)-askorbaatti, kide	$C_6H_7NaO_6$	134-03-2	A7631 100G	≥ 98 %	Sigma-Aldrich

Radioleimauksissa käytetyt liuottimet on eritelty taulukossa 4. [^{18}F]1 ja [^{18}F]2:n radiosynteeiseissä on hyvä käyttää mahdollisimman puhtaita kemikaaleja, ettei ei-haluttuja radioaktiivisia sivutuotteita muodostu epäpuhtautena. Tyypillisen deionisoidun veden sijasta käytettiin milli-Q vettä kaikissa kokeellisen työn vaiheissa.

Taulukko 4. Radiosynteesissä käytetyt kemikaalit.

Kemikaali	Molekyylikaava	CAS	Tuotenumero	Laatu (%)	Tuottaja
Natriumkloridi	NaCl	7647-14-5	1042420 1 kg	Analyttinen	Fisher Scientific
DNA-laatuinen asetonitriili	CH ₃ CN	75-05-8	1126360050 50 ml	DNA-laatu (maks. 10 ppm H ₂ O)	Merck
Pyridatsiini	C ₄ H ₄ N ₂	289-80-5	P57204 5 g	98 %	Sigma-Aldrich

Radioleimattujen tuotteiden laadunvarmistuksessa käytetyt kemikaalit on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Laadunvarmistuksessa ja puhdistuksissa käytetyt kemikaalit.

Kemikaali	Molekyylikaava	CAS	Tuotenumero	Laatu	Tuottaja
Trifluorietikkahappo	C ₂ HF ₃ O ₂	76-05-1	1673706 100 ml	Laboratorio reagenssilaatu	Fisher Scientific
Asetonitriili	CH ₃ CN	75-05-8	34998 2,5 L	≥99.9%, HPLC-laatu	Sigma-Aldrich
Metanoli	CH ₃ OH	67-56-1	34860 2,5 L	≥99% HPLC-laatu	Riedel- de Haën Ag Seelze-Hannover
Etyyliasetatti	CH ₃ COOC ₂ H ₅	141-78-6	BDH83621.320 2,5 L	≥99.5%	VWR

3.2.3 Liuosten valmistus

Pyridatsiini/suolahappopuskuriliuos 1M pH 2.0

Puskuri valmistettiin 15 ml sentrifugiputkeen. Pyridatsiinia (720 µl) laimennettiin 5 ml:lla dimetyyliformamidilla ja 2,5 ml vettä (milli-Q). Puskuriliuoksen pH säädettiin happamaksi (pH 2.0) 4 M suolahappoliuoksella. Lopuksi puskuriliuos laimennettiin vedellä (milli-Q) kokonaistilavuuteen 10 ml. Puskuri säilytettiin jääkaapissa (+ 4 °C) kuukauden ajan, jonka aikana sen pH:ta seurattiin viikoittain ja tarvittaessa säädettiin jälleen laimealla suolahappoliuoksella. Isotooppisen vaihdon kannalta puskurin pH:n tuli olla välillä 2.0-2.5, jotta radioleimauksessa saatiin mahdollisimman hyvä radiokemiallinen saanto.

Natriumkloridiliuos 0,9 % (m-%)

Liuoksen valmistusta varten punnittiin 9,0838 g natriumkloridia mittapulloon. Natriumkloridi liuotettiin ensin 700 ml milliQ-vettä. Lopuksi liuos laimennettiin 1000 ml:aan.

Suolahappoliuos 4 M

Väkevää suolahappoa (HCl, 33,3 ml, 37 % m/m) laimennettiin 100 ml milli-Q veteen.

Kaliumbifluoridiliuos 3 M

Kaliumbifluoridia ($M = 78,103 \text{ g/mol}$) punnittiin 3,5157 g (45 mmol). Punnittu määrä liuotettiin 15 ml vettä (milli-Q).

Kaliumpermanganaattiliuos värjäysliuos

Punnittiin kiinteää kaliumpermanganaattia ($M = 158,034 \text{ g/mol}$) 1,5050 g (9,5 mmol) (ohjeellinen 1,5 g) ja kaliumkarbonaattia ($M = 138,205 \text{ g/mol}$) 0,9984 g (7,2 mmol) (ohjeellinen 1 g). Seos liuotettiin 200 ml vettä (milli-Q) ja lopuksi valmistettuun liuokseen lisättiin 3,1 ml 1 M natriumhydroksidiliuosta (NaOH).

1 M Kupari(II)sulfaattiliuos

Kupari(II)sulfaattiliuosta ($M = 159,61 \text{ g/mol}$) valmistettiin 1 ml punnitsemalla suolaa 0,1607 g (1 mmol). Suola liuotettiin 1 ml:aan milliQ-vettä.

1 M Natrium(I)askorbaattiliuos

Natriumaskorbaattia ($M = 198,11 \text{ g/mol}$) punnittiin 1 ml:in liuosta varten 0,1985 g (1 mmol). Lopuksi punnittu natriumaskorbaatti liuotettiin 1 ml:aan milliQ-veteen.

5 % Ammoniumhydroksidiliuos

Valmistettiin MeCN:H₂O liuos pipetoimalla täyspipetillä sekä asetonitriliä että milliQ-vettä 475 µl. Lopuksi tähän liuokseen pipetoitiin väkevää ammoniakkia (25 % v/v) 50 µl.

0,02 M Fosfaattipuskuriliuos (pH 7.4)

KH₂PO₄ ($M = 136,086 \text{ g/mol}$) 68 mg (5 mmol) ja 244 mg (1,4 mmol) K₂HPO₄ ($M = 174,2 \text{ g/mol}$) liuotettiin 80 ml:aan milli-Q vettä. Liuoksen pH säädettiin 7.4 lisäämällä fosforihappoa. Lopuksi liuos laimennettiin 100 ml:aan milli-Q vedellä.

4 mM Kaliumbifluoridiliuos

Kaliumbifluoridia ($M = 78,103 \text{ g/mol}$) punnittiin 6,2 mg (7,9 mmol), joka liuotettiin 20 ml vettä (milli-Q).

3.2.4 Yhtälöt

Orgaanisten synteesien lopputuotteiden prosentuaalinen saanto laskettiin suhteessa teoreettiseen. Teoreettinen saanto määräytyy reaktiota rajoittavan reagenssin perusteella, joka on riippuvainen reaktion stoikiometrisista ekvivalenteista tai reaktioon lisätyistä ainemääristä. Saanto lasketaan kaavan 1 mukaan

$$m_{saanto}(\%) = \frac{m_{lopputuote}}{m_{teoreettinen}} * 100 \% \quad (1),$$

missä m_{saanto} on lopputuotteen reaktiosaanto (%), $m_{lopputuote}$ lopputuotteen massa (g) ja $m_{teoreettinen}$ teoreettinen reaktiosaanto (%).

Gammailmaisimen mittaustuloksesta saadut pulssit muunnettiin taustasäteilykorjauksen jälkeen kaavan 2 mukaan. Tästä edelleen aktiivisuuden keskivirhe voitiin laskea kaavan 3 avulla

$$A(Bq) = \frac{N}{t} \quad (2) \text{ ja}$$

$$\Delta A (Bq) = \frac{\sqrt{N}}{t} \quad (3),$$

missä N vastaa pulssien lukumäärää taustakorjauksen jälkeen, t mittausaika (min), A aktiivisuus (Bq) ja ΔA on aktiivisuuden keskivirhe (Bq).

Patruunaan pidättynyttä aktiivisuutta varten mitattiin aina reaktioastian, kohtiovesijäteastian ja kohtiovesipullon aktiivisuudet sekä μ QMA-patruunan että kohtiovesipullon jäännösaktiivisuus. Kaikki aktiivisuuslukemat puoliintumisaikakorjattiin säteilytyksen loppumisen ajankohtaan (EOB, end of bombardment) kaavalla 4 ja lähtöaktiivisuudet määritettiin kaavan 5 avulla

$$A = A_0 * 2^{-\frac{t}{t_1}} \quad (4) \text{ ja}$$

$$\Leftrightarrow A_0 = \frac{A}{2^{-\frac{t}{t_1}}} \quad (5),$$

missä A vastaa mitatun näytteen aktiivisuutta mittaussajanhetkellä (MBq), A_0 näytteen lähtöaktiivisuutta ajanhetkellä EOB (MBq), t näytteen mittaussajankohta (min) ja $t_{1/2}$ radionuklidin (F-18) puoliintumisaika (min).

Eluointitehokkuus laskettiin kaavalla 6

$$\text{Eluointitehokkuus (\%)} = \frac{A_1}{A_0} * 100 \% \quad (6),$$

missä A_1 on reaktioastian aktiivisuus (MBq) ja A_0 on μ QMA:han pidättynyt aktiivisuus (MBq) eli reaktion lähtöaktiivisuus.

Radioleimatun lopputuotteen aktiivisuus puoliintumisaikakorjattiin ja radiokemiallinen saanto laskettiin edelleen kaavan 7 mukaan

$$RCY_0 = \frac{A_0(\text{prekursori})}{A_0(\mu QMA)} * 100 \% \quad (7),$$

missä $A_0(\text{prekursori})$ on prekursorin puoliintumisaikakorjattu aktiivisuus (MBq), $A_0(\mu QMA)$ reaktion lähtöaktiivisuus ja RCY_0 puoliintumisaikakorjattu radiokemiallinen saanto (RCY).

Jakautumiskertoimen määrittämisessä laskettiin kunkin faasin aktiivisuuksien keskiarvon kaavan 8 avulla

$$A_{ka} = \frac{A_1 + \dots + A_n}{n} \quad (8),$$

missä n on joukon koko (lukumäärä), A_{ka} aktiivisuuksien keskiarvo (Bq) ja A_1, \dots, A_n näytteen aktiivisuus (Bq).

Keskiarvon keskihajonta laskettiin kaavalla 9

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - A_{ka})^2}{n - 1}} \quad (9),$$

missä s on keskihajonta.

Jakautumiskerroin laskettiin yhtälön 10 mukaan

$$D = \frac{\left(\frac{CPM}{g}\right)_{1-oktanoli}}{\left(\frac{CPM}{g}\right)_{puskuri}} = \frac{R_{1-oktanoli}}{R_{puskuri}} \quad (10),$$

missä D on jakautumiskerroin pH:ssa 7.4, $\left(\frac{CPM}{g}\right)_{1-oktanoli} = R_{1-oktanoli}$ on merkkiaineen aktiivisuus CPM:na 1-oktanolifaasissa massayksikköä (g) kohti ja $\left(\frac{CPM}{g}\right)_{puskuri} = R_{puskuri}$ merkkiaineen aktiivisuus CPM:na fosfaattipuskurifaasissa massayksikköä (g) kohti.

Jakaantumiskertoimen keskivirhe laskettiin virheen etenemislain avulla

$$\begin{aligned} \Delta D_{7.4} &= \sqrt{\left(\frac{\partial D_{7.4}}{\partial R_{puskuri}} * \Delta R_{1-oktanoli}\right)^2 + \left(\frac{\partial D_{7.4}}{\partial R_{1-oktanoli}} * \Delta R_{puskuri}\right)^2} \\ &= \sqrt{\left(\frac{\Delta R_{1-oktanoli}}{R_{puskuri}}\right)^2 + \left(-\frac{\Delta R_{puskuri} * R_{1-oktanoli}}{(\Delta R_{puskuri})^2}\right)^2} \end{aligned} \quad (11),$$

missä $\Delta R_{1-oktanoli}/puskuri$ on keskivirhe merkkiaineen CPM:lle 1-oktanoli-/puskurifaasissa massayksikköä (g) kohti ja $\Delta D_{7.4}$ jakaantumiskertoimen keskivirhe.

Logaritmisen jakaantumiskertoimen keskivirheen yhtälö määritettiin myös virheen etenemislain avulla

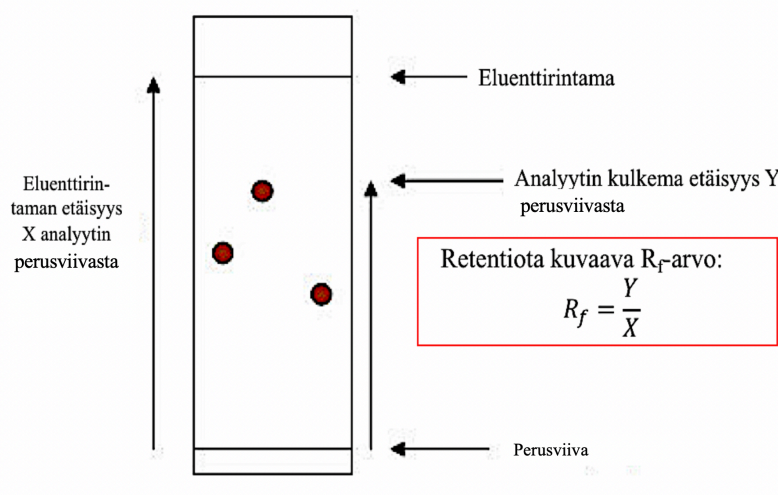
$$\begin{aligned} \Delta \log D_{7.4} &= \sqrt{\left(\frac{\partial \log D_{7.4}}{\partial D_{7.4}} * \Delta D_{7.4}\right)^2} \\ &= \sqrt{\left(\frac{\log(e)}{D_{7.4}} * \Delta D_{7.4}\right)^2} \end{aligned} \quad (12),$$

missä $\Delta \log D_{7.4}$ on logaritmisen jakaantumiskertoimen keskivirhe.

Yhdisteiden retentiotekijä laskettiin kaavan 13 mukaisesti

$$R_f = \frac{\text{Tutkittavan yhdisteen kulkema matka perusviivasta mitattuna (cm)}}{\text{Eluenttirintaman kulkema matka perusviivasta luettuna (cm)}} \quad (13),$$

missä R_f on retentiotekijä. Kaavan 13 etäisyydet mitataan perusviivaan suhteen (Kuva 22).



Kuva 22. Ohutlevykerroskromatografian suorittamisen periaate.

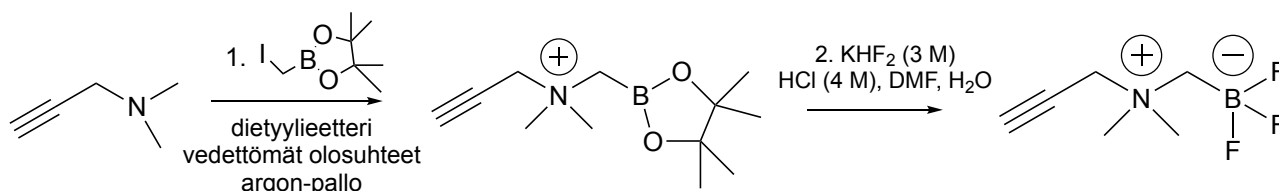
3.3 Orgaaninen synteesi ja karakterisointi

AMBF₃ ja AMBF₃-PEG₄-mTz:n prosteettisten ryhmien synteessissä noudatettiin Perrinin tutkimusryhmän optimoimia reaktio-olosuhteita⁸². Ainoastaan tuotteiden puhdistukset tehtiin eri tavalla. Puhdistettujen lopputuotteiden karakterisoinnissa käytettiin useampaa 1 D NMR-menetelmää (¹H, ¹³C, ¹⁹F ja ¹¹B). Lisäksi tuotteiden puhtauden määrittämisessä käytettiin korkeanerotuskyvyn liuuskromatografiaa (HPLC) yhdistettynä UV-detektoriin. AMBF₃:n kohdalla tätä ei voitu kuitenkaan hyödyntää, sillä yksinkertaisessa molekyyli-rakenteessa oleva kolmoissidos ei ollut riittävä tuottamaan UV-signaalia spektrissä.

3.3.1 AMBF₃ orgaaninen synteesi ja karakterisointi

Perrinin tutkimusryhmä on julkaissut useita eri tutkimusartikkeleita fluori-18 radionuklidilla leimatuista organotrifluoriboraateista ja niiden biokonjugaatiosta peptideihin.^{76,82,89} N-propargyyli-N,N-dimetyyli-ammoniummetyyli-trifluoriboraatti (AMBF₃) syntetisoitiin Perrinin tutkimusryhmän 2015 julkaisun mukaisesti⁸². Synteesi on kaksivaiheinen (Kuva 23): ensimmäisessä vaiheessa N,N-

dimetyylipropargylamiinista tuotetaan välituotteena N-propargyyli-N,N-dimetyylammonium-metyylibooripinakolaatti, ja toisessa vaiheessa raakatuote fluorataan kaliumbifluoridiliuoksella tuottaen lopputuotteena kahtaisionin, N-propargyyli-N,N-dimetyyliammoniummetyylitrifluoriboraatin.



Kuva 23. AMBF₃ prekursorin orgaaninen synteisi.

N-propargyyli-N,N-dimetyyliammonium-metyylibooripinakolaatti: Ensimmäinen reaktiovaihe vaati vedettömät olosuhteet, joten reaktioon vaadittavat astiat (kaksikaulakolvi ja lasikorkki) pidettiin yön yli uunissa ja ennen reaktion aloitus astiat jäähdytettiin argonkaasulla. Kolvin sisälle laitettiin magneettisauva, minkä jälkeen kolvin toinen kaula suljettiin kumiseptalla, jossa oli argonpallo ohuella neulalla (23-27 G) kiinnitettynä. Lähtöainetta (3-dimetyyliamino-1-propyyini) pipetoitiin 200 µl (186 nmol) 2 ml:aan kuivaa eetteriä. Tämä seos lisättiin kolviin ruiskun ja neulan (23 G) avulla septan läpi. Jodimetyyliboorihapon pinakoliesteriä pipetoitiin 230 µl (126 nmol) 3 ml:aan kuivaa eetteriä (reaktioseoksen kokonaistilavuus 5 ml). Seos lisättiin lähtöaineen joukkoon ruiskun ja neulan kautta septumin läpi tipoittain. Reaktioseokseen muodostui pinakoliesterin lisäyksen jälkeen jo selkeä kellertävän valkoinen sakka. Reaktioon annettiin kuitenkin edetä 1,5 tunnin ajan, minkä jälkeen muodostunut sakka imusuodatettiin muusta reaktioseoksesta ja sakkaa huuhdeltiin kylmällä dietyylieetterillä (>15 ml) niin, että sakan kellertävä väri vaaleni. Raakatuote kuivattiin taaratussa kolvissa vakuuminlinjastossa öljypumpulla varustettuna kahden tunnin ajan. Lopputuotteen saannoksi saatiin näin kahdessa eri synteesissä 89 % (IH190131-1) ja 67 % (IH190306-1) teoreettisesta saannosta. Raakatuotteesta ajettiin ¹H NMR (400 MHz, *d*₃-CDCl₃): δ(ppm) = 1.32 (s, 12 H), 3.61 (s, 6 H), 4.89 (d, 2 H), 2.88 (t, 1 H) (¹H NMR katso Liite 1). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₃-CDCl₃) δ(ppm) = 86.80, 82.67, 72.22, 60.00, 57.80, 54.07 (¹³C NMR; katso Liite 2). ¹¹B NMR:ssä (128 MHz, *d*₃-CDCl₃) havaittiin booriatomin siirtymä 30.24 ppm (¹¹B NMR; katso Liite 3).

N-propargyyli-N,N-dimetyyliammonium-metyylitrifluoriboraatti: Toinen reaktiovaihe toistettiin useaan otteeseen, sillä kahtaisionin puhdistusmenetelmää oli optimoitava. Synteesin skaalaus suhteutettiin lopputuotteen 21 mg:n saantoon, jota käytettiin Perrinin tutkimusryhmän julkaisussa⁸².

Parhaimman saannon synteesissä välituotetta (erä IH190306-1) punnittiin 50,7 mg (226 nmol). Välituote liuotettiin 15 ml:n sentrifuugiputkessa seuraaviin seoskomponentteihin vastaavassa järjestyksessä: milliQ-vesi (200 µl), dimetyyliformamidi (600 µl), kaliumbifluoridi- (KHF₂, 3 M, 300 µl) ja suolahappovesiliuos (HCl, 4 M, 300 µl). Reaktioseosta lämmitettiin 74,3 °C:ssa 2 tunnin ja 12 minuutin ajan. Reaktiota monitoroitiin TLC:llä 30 minuutin, 1 tunnin ja 2 tunnin kohdalla (EtAc:MeOH 9:1, silikalevy). TLC-levyt tarkastettiin UV-lampun alla ja värjättiin vielä KMnO₄-väriliuoksella. Reaktion aikana muodostuu pieniä määriä vetyfluoridikaasua, joten reaktio on suoritettava vetokaapissa. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 10 µl väkevää ammoniumhydroksidia.

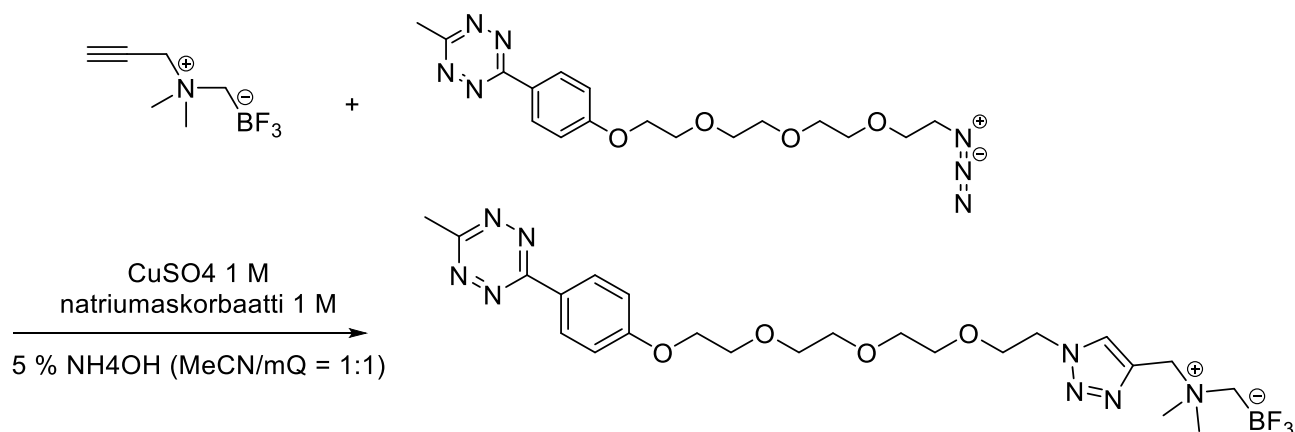
Reaktioseoksen puhdistusta varten esivalmisteltiin kaksi Seppak alumina- ja silikapatruunaa eluoimalla niiden läpi ensin 80 ml vettä ja lopuksi 10 ml puhdistuksessa käytettyä eluenttia EtAc:MeOH (95:5). Reaktioseoksen joukkoon lisättiin EtAc/MeOH-eluenttia 6 ml:iin asti. Tämä seos ladattiin patruunajonoon ja läpi tullut liuos kerättiin ensimmäiseen koeputkeen. Seuraavaksi patruunoihin pidäytyneet reaktioseoksen komponentteja alettiin eluoida EtAc:MeOH (95:5) eluentilla 2 ml:n fraktioissa. Fraktiot ajettiin samalla TLC olosuhteella kuin reaktion monitoroinnissa. Puhdas lopputuote nousi levyllä retentiotekijällä (*R_f*) 0,4 fraktioissa 2-7. Suurin osa puhdistuseluenteesta haihdutettiin pyöröhaihduttimella siten, että lopputuotetta sisältävät fraktiot kerättiin pyörökolviin. Reaktiossa käytettyä dimetyyliformamidin haihdutusta jatkettiin puhdistuksen ja ensimmäisen haihdutuksen jälkeen Biotage V-10 Evaporator haihdutuslaitteella (haihdutusohjelma Very High Volatile Solvents) kolme kertaa, jotta DMF haihtuisi kauttaaltaan puhdistetusta lopputuotteesta. Astiasta toiseen siirtämisen yhteydessä astioita huuhdeltiin välissä asetonitriilillä, jotta merkittävin osa lopputuotetta saatiin kerättyä talteen. Puhdistuksen ja haihdutuksien jälkeen lopputuote oli valkoinen kiinteä jauhe 26,7 mg (0,162 mmol) 72 %:n saannolla.

Puhdistetusta lopputuotteesta ajettiin ¹³C-, ¹¹B-, ¹⁹F- ja ¹H NMR. ¹H NMR (400 MHz, *d*₃-CD₃CN) analyysin perusteella puhtaalle lopputuotteelle analysoitiin seuraavat piikit: δ(ppm)= 4.10 (d, 2 H), 3.09 ppm (m, 7 H), 2.46 (b, 2 H) (¹H NMR; katso Liite 4). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₃-CD₃CN) spektristä lopputuotteelle havaittiin signaalit: δ(ppm) = 80,96, 73.51, 57.72, 53.42, 25.10 (¹³C NMR; katso Liite 5). Trifluoriboraattiryhmä voidaan spesifisesti karakterisoida ¹⁹F (Liite 6) ja ¹¹B NMR:n (Liite 7) avulla. ¹⁹F NMR:n avulla voidaan todentaa kylmäfluorauksen lopputulos ja määrittää onko puhdistetussa fraktiossa vapaata fluoria, joka huonontaa radioleimaussaantoa. Trifluoriboraattifunktionaalisuus näkyy ¹⁹F NMR-spektrissä (376 MHz, *d*₃-CD₃CN) siirtymällä δ (ppm)= -139.07 (3 F, dd, J = 99.2, 49.2 Hz) ja ¹¹B NMR-spektrissä (128 MHz, *d*₃-CD₃CN) δ (ppm)= 2.22. Massaspektrometrianalyysissä (Liite 8), TOF-ESI-MS, havaittiin seuraavien adduktien piikit: 353,1815

$[M+Na]^+$ (laskennallinen $m/z=352,9216$), $369,1595$ $[2M+K]^+$ (laskennallinen $m/z=368,8956$) ja $[2M-F]^+$ $311,1935$ (laskennallinen $m/z = 310,9216$). Synteesissä käytetyistä lähtöaineista ajettiin myös kaikki vastaavat spektrit, jotka löytyvät liitteistä 12-16.

3.3.2 AMBF₃-PEG₄-mTz orgaaninen synteesi ja karakterisointi

AMBF₃:n (5 mg, 30 μ mol, 5 ekvivalenttia) liuotettiin 160 μ l vettä (milli- Q, 80 μ l DMF ja 100 μ l asetonitriiliä. Toista lähtöainetta mTz-PEG₄-atsidia punnittiin 1,8 mg (4,6 μ mol, 1 ekvivalentti). Tämä lisättiin AMBF₃:n joukkoon liuotettuna 5 μ l 1M CuSO₄ (5 μ mol), 12,5 μ l natriumaskorbaattiin 1 M ja 50 μ l 5 % NH₄OH (50 % MeCN:H₂O) seokseen. Reaktio lämmitettiin vesihauteessa 45 °C:een kahden tunnin ajaksi. Reaktiokaava on esitetty kuvassa 21. Reaktioseos oli koko reaktion ajan vaaleanpunainen.



Kuva 24. AMBF₃-PEG₄-mTz prekursorin orgaaninen synteesi.

Reaktioseos puhdistettiin C18 patruunalla (Light, Seppak). Ennen patruunapuhdistusta reaktioseos laimennettiin vedellä (10 ml, milli-Q). Kaksi C18 patruunaa esivalmisteltiin eluoimalla 3 ml asetonitriilillä ja 5 ml vedellä (milliQ). Laimennettu reaktioseos työnnettiin 12 ml ruiskulla patruunaan ja läpi tullut vesi kerättiin erilliseen astiaan. Tässä kohtaan nähtiin vaaleanpunaisen tuotteen pidättyvän ensimmäiseen patruunaan. Seuraavaksi puhdistettiin nousevalla gradientilla seuraavasti: H₂O:MeCN (90:10) 2 ml, H₂O:MeCN (80:20) 2 ml ja H₂O:MeCN (70:30) 4 ml. Tähän mennessä läpi tullut erittäin vaalea vaaleanpunainen eluentti oli kerätty samaan astiaan. Lopuksi eluoiitiin 4 ml H₂O:MeCN (60:40) ja läpi eluoitunut tuote kerättiin erilliseen astiaan. Tässä kohtaan kerätty fraktio oli intensiivisen vaaleanpunainen. Puhdistettu fraktio haihdutettiin Biotagen Evaporator 10 laitteella.

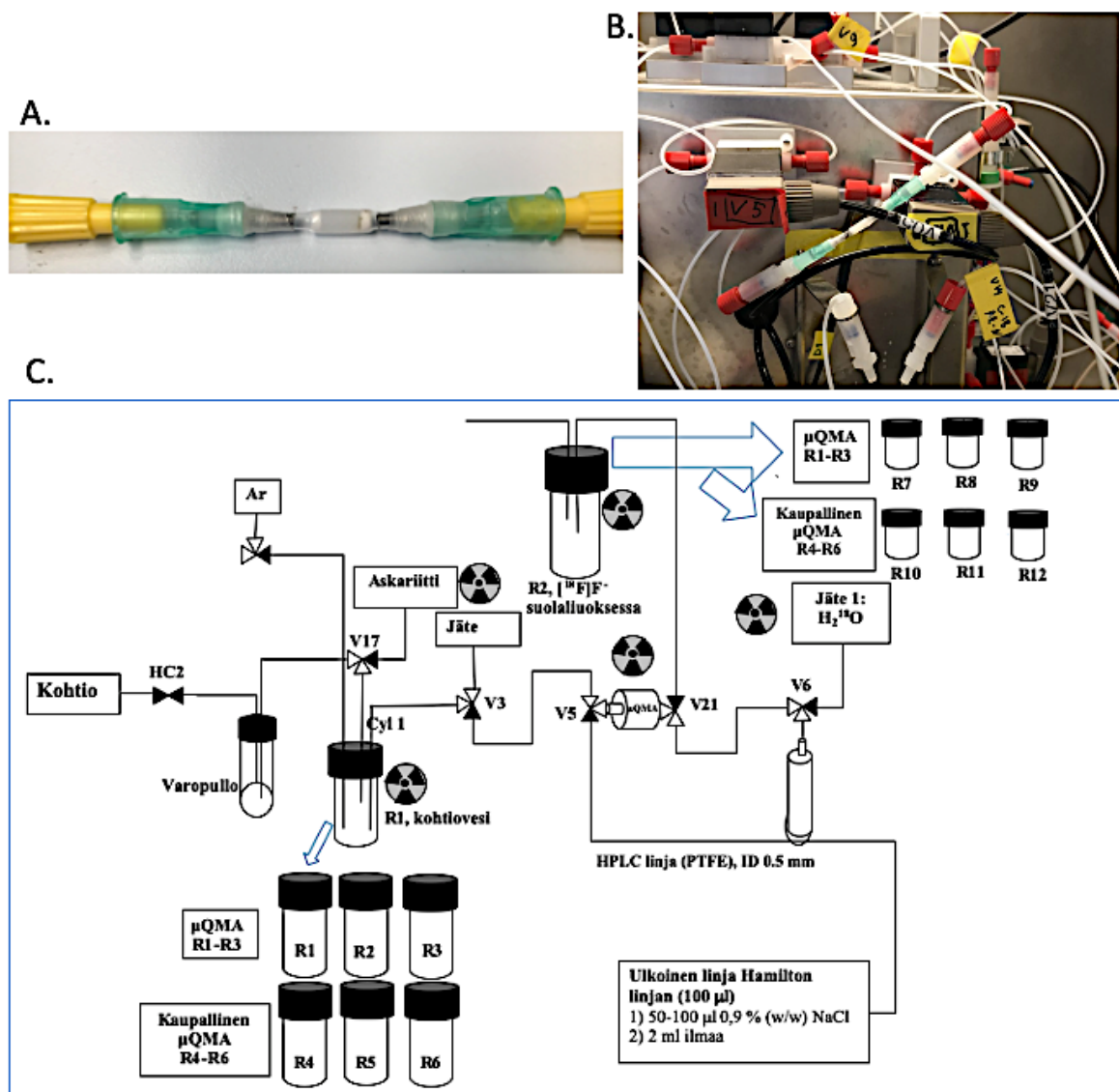
Tuotteen rakenne karakterisoitiin NMR:llä (^1H NMR; Liite 9 ja ^{19}F NMR; Liite 10). Tuotteen saannoksi saatiin 1,6 mg (2,9 μmol ; 62,5 %) ja se liuotettiin 225 μl :aan DNA-laatuiseen asetonitriiliin radioleimauksia varten. Tuotteen puhtaus (95,7%, aallonpituudella 254 nm) määritettiin korkeanerotuskyvyn nestekromatografialla ja UV-detektorilla. Tuotteesta analysoitiin myös ESI-TOF massaspektrometri. ^1H NMR (400 MHz, $d_3\text{-CD}_3\text{CN}$) analyysin perusteella puhtaalle AMBF₃-PEG₄-mTz:lle analysoitiin seuraavat piikit: δ (ppm) = 2.30 (3 H, b), 2.98 (9 H, d, $J = 9.3$), 3.52-3.60 (6 H, m), 3.61-3.67 (2 H, m), 3.80-3.89 (4 H, m), 4.21-4.26 (2 H, m), 4.46 (2 H, s), 4.52-4.57 (2 H, m), 7.14-7.18 (2 H, m), 8.12 (1 H, s), 8.45-8.50 (2 H, m). Trifluoriboraattifunktionaalisuus pystyttiin paikantamaan ^{19}F -NMR spektrometrialla (376 MHz, $d_3\text{-CD}_3\text{CN}$) δ (ppm) = -138.38 (3 F, dd, $J = 93.9, 49.2$ Hz). Massaspektrometrianalyysissä (Liite 11), TOF-ESI-MS, havaittiin seuraavien adduktien piikit: $[\text{M}+\text{Na}]$ 577,2698 (laskettu m/z 577,3720) ja $[\text{M}-\text{F}]$ 535,2784 (laskettu m/z 535,3838). mTz-PEG₄-atsidin protoni- ja hiili-NMR karakterisointi on esitetty liitteissä 17 (400 MHz, $d_3\text{-CDCl}_3$) ja 18 (100 MHz, $d_3\text{-CDCl}_3$).

3.4 [^{18}F]1 radiosynteesi

[^{18}F]1:n radiosynteesin optimointiin sisällytettiin useita vaiheita, joista eniten keskityttiin [^{18}F]fluoridin konsentroimiseen μQMA -patruunasta ja lopullisen optimoidun automatisoidun radiosynteesin toistettavuuteen. Lisäksi määritettiin [^{18}F]1:lle sopivat radioleimausolosuhteet ja radiosynteesin laadunvarmistusmenetelmät. Kaikissa säteilytyksissä ja radioleimauksissa tuotetun radioaktiivisuuden suuruus oli 1-2 GBq luokkaa. Useammassa radioleimauksessa tuotettu radioaktiivisuus jaettiin useampaan radioleimauserään, jolloin alhaisin kokeissa käytetty radioaktiivisuus oli 100-300 MBq luokkaa.

3.4.1 Fluori-18 konsentroidi

Automatisoidun synteesikaavakkeen optimointia varten tutkittiin ennen varsinaisia radioleimauksia radioaktiivisen fluori-18 pidättäytymistä kaupalliseen μQMA -patruunaan. Tämän lisäksi kokeiltiin itse koottua μQMA - ja kaupallista PS-HCO₃-patruunaa (Kuva 25).



Kuva 25. Fluori-18 konsentrointitestit μ QMA-patruunalla. (A) Kaupallisen μ QMA-patruunan päätyihin liitettiin katkaistut neulat (G) parafilmin kanssa. (B) Patruuna asetettiin synteesiyksikköön lyhyiden siirtolinjojen (PTFE) varassa kahden venttiilin väliin. (C) Konsentroidi testeissä käytettiin synteesikaaviota, jossa kohtiovesi eluoiattiin patruunaan läpi automatisoidun ruiskun avulla ja pidättäytynyt fluoridi eluoiattiin ulkoisen siirtolinjan kautta 0,9 % natriumkloridiliuoksella.

Patruuna tasapainotettiin jokaisen radioleimauksen alussa seuraavasti: 3 ml vettä (milli-Q), 3 ml ylikylläisellä natriumkloridisuolavesiliuoksella (brine) ja 3 ml vettä (milli-Q). Jos päivän aikana tehtiin useampi kuin yksi eluointi, patruuna esikäsiteltiin samalla tavalla paitsi kylläinen NaCl-liuos korvattiin 3 ml:lla 0,9 % natriumkloridiliuoksella synteesiyksikköön asennetun ulkoisen linjan kautta (Kuva 25, C). Ulkoiseen linjaan valittiin halkaisijaltaan pienempi teflonlinja (0,5 mm) kuin muut synteesiyksikön linjat (mm). Synteesikaavio rakennettiin siten, että kohtioveden fluori-18 saatiin pidättymään patruunaan vetämällä kohtiovesi R1-astiasta kaavioon yhdistetyn automatisoidun ruiskun avulla ja ruiskuun vedetty kohtiovesi injisoitiin ruiskusta edelleen ^{18}O -rikastetulla vedelle

tarkoitettuun jätepulloon. Aktiivisuuden pidättymistä patruunaan seurattiin siihen kiinnitettyjen detektorien avulla.

Radioleimauksen optimoinnin kannalta patruunan kykyä pidättää [^{18}F]fluoridia tutkittiin eri eluointitilavuuksien avulla (50 μl , 70 μl ja 100 μl). Eluointitesteissä mitattiin aina kohtiovesiastian lähtö- ja jäännösaktiivisuus (R1), ^{18}O -rikastetun veden jätepullon (patruunasta läpikäytetty aktiivisuus) ja suolaliuoksella eluoidun [^{18}F]fluoridin aktiivisuus (R2). Lisäksi testattiin, kuinka patruunan kuivaus argonkaasulla vaikutti fluoridin konsentroiduuteen. Jokaiselle eluointitilavuudelle tehtiin kolme kokeilua: eluointi määritetystä patruunasta, patruunan kuivaus argonkaasulla 30 sekunnin jälkeen ja kuivaus 2-3 minuutin jälkeen. Pienempien eluointimäärien lisäksi eluoidun fluoridin aktiivisuutta testattiin vielä suuremmilla tilavuuksilla (150 μl ja 200 μl), mutta tämä suoritettiin samanaikaisesti prekursorin radioleimausolosuhteita optimoitaessa (3.4.2).

3.4.2 [^{18}F]1 radiosynteesin automatisointi ja reaktio-olosuhteet

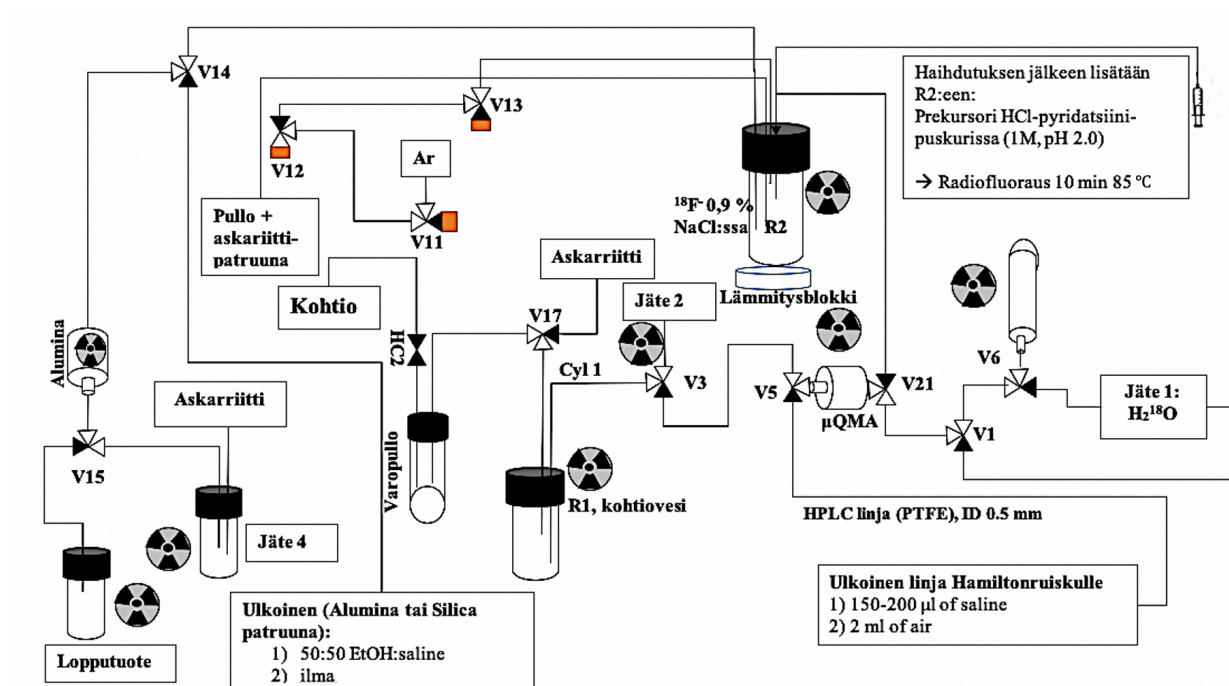
Ensimmäiset radioleimaukset suoritettiin manuaalisesti pipetoimalla erilaisia reaktioseoksia neljään 15 ml:n polypropyleenisentrifuugiputkeen (Falcon). Reaktioseokseen pipetoitiin 10 μl pyridiini-suolahappopuskuriliuosta, 10 μl [^{18}F]fluoridinatriumkloridiliuosta, prekursoria DNA-laatuiseen asetonitriiliin liuotettuna kahdessa eri konsentraatiossa ja kahteen putkeen lisättiin edellä mainittujen lisäksi 2 μl 4 mM kaliumbifluoridiliuosta. Reaktioita pidettiin 85 °C:ssa 10 ja 15 minuutin ajan. Näiden kokeiden perusteella radiosynteesin automatisoinnin optimointia jatkettiin siten, että prekursorin ainemäärä reaktiossa pidettiin 100 nmol:ssa eikä radiosynteseissä käytetty kantajaa. Reaktioaikana pidettiin 15 minuuttia eikä lämpötilaa muutettu. Reaktioseosten pH:ta seurattiin, sillä reaktio on pH-riippuvainen ja se oli pidettävä riittävän happamana (pH 2.0).

Radiokemiallinen saanto (RCY) ja puhtaus (RCP) määritettiin kromatografisin menetelmin: radio-TLC ja -UV-HPLC. Ohutkerroslevykromatografiassa käytettiin normaalifaasimenetelmää ja ajoliuksena etyyliasetaatti:metanoli-seosta (9:1), johon oli lisätty 0,1 % (v-%) trifluorietikkahappo (TFA). Kuiva TLC-levy skannattiin FLA-skannerilla ja tulosten perusteella määritettiin RCP ja RCY. Vaikka prekursoria ei pystytty havaitsemaan HPLC:n UV-detektorin avulla, ^{18}F -leimattu prekursori pystyttiin havaitsemaan radiodetektorin avulla. Kolonnina käytettiin Alltima 5 μm C18 (250 x 4,6 mm), eluenteina asetonitriili:vesi (milli-Q) 0,1 % TFA:lla, virtausnopeus 1 ml/min ja binaarista gradienttia 0 % (0,01 min), 5 % (5 min), 50 % (15 min), 100 % (20 min) ja 0 % (25 min). Tätä ei

kuitenkaan jatkossa käytetty, sillä karakterisointimenetelmänä radio-HPLC ei ole luotettava ellei radiopiikin retentiota voida todentaa referenssiajon UV-signaalin retentiolla.

Fluori-18 leimattu merkkiaine, [^{18}F]1, puhdistettiin radioleimauksen päätteeksi Alumina N SepPak patruunalla, joka esikäsiteltiin 80 ml vettä (milli-Q) ja 10 ml:lla laadunvarmistuksessa käytetyllä ajoliuoksella. Esikäsitteilyn jälkeen patruunan läpi työnnettiin vielä 3 ml ilmaa. Radiosynteesissä reaktioseos työnnettiin patruunaan ja pidähtynyt merkkiaine eluoitiin seuraavaksi 1-2 ml:lla etanoli:vesi(milli-Q) (1:1) seoksella.

Radiosynteesin automatisoinnin käytännön ratkaisuissa sovellettiin Perrinin tutkimusryhmän julkaisua⁷⁶. Reaktioastioiksi valittiin polypropyleenisentrifuugiputket (15 ml), koska kahtaisioni absorboituu herkästi tyypillisesti käytettäviin borosilikaattilasiastioihin. Tämän takia synteesikaaviossa käytettiin erillistä lämmityslaitetta synteesiyksikön lasipulloille tarkoitetun lämmityslaitteen sijasta.



Kuva 26. [^{18}F]1 radioleimauksessa käytetty synteesikaavio.

Kuvassa 26 (Liite 19) on esitetty radioleimauksessa käytetty synteesikaavio. Radiosynteesit tehtiin Hot Cell 2:ssa ja kutakin radioleimausta kohti tuotettiin [^{18}F]fluoridia kohtiovirroilla 2-4 μAh IBA 10/5 D2-syklotronilla ^{18}O -kohtiovedestä. [^{18}F]vesi siirrettiin syklotronilta teflonsiirtolinjoja pitkin

Hot Cell 2:een varopullon kautta R1-astiaan heliumkaasuvirtauksen avulla. R1-astiaan oli liitetty kaksi linjaa, joissa neulat olivat aloitus asennossa ylhäällä: linja venttiili 17 ja venttiili 3 liitetty linja. Kohtioveden onnistuneen siirron jälkeen V17 aktivoitiin, jolloin R1 oli auki jäteastian askarriittiin. Ennen jatkotoimenpiteitä R1:ssä kiinni olevat linjat irrotettiin ja R1 aktiivisuus mitattiin annoskalibraattorilla.

Mittauksen jälkeen neulat asetettiin takaisin R1:een ja venttiili 3 linjan neula työnnettiin reaktioastian pohjalle. Venttiili 3 aktivoitiin seuraavaksi ja automaattiruisku aktivoitiin ”load” asentoon. Automaattiruiskuun alettiin vetää hitaasti ilmaa, jolloin R1:n kohtiovesi siirtyi μ QMA-patruunan kautta ruiskuun. Kun suurin osa kohtiovedestä oli vedetty ruiskuun, aktivoitiin venttiili 6 ja aktivoitiin automaattiruisku ”inject” asentoon. Kohtiovesi siirrettiin ruiskusta kohtiovedelle tarkoitettuun jäteastiaan. Sama vaihe toistettiin vielä kerran vetämällä ruiskuun ilmaa, jotta mahdollisimman suurin osa kohtiovedestä saatiin hyödynnettyä konsentroiduksi. Näiden vaiheiden aikana seurattiin detektoreita, jotka olivat kiinni μ QMA-patruunan ja kohtiovesijäteastian lähellä. Kohtioveden siirron lopuksi inaktivoitiin V6 ja palautettiin ruisku takaisin ”load” asentoon.

Patruuna esikäsiteltiin ennen radiosynteesin alkua eikä sitä kuivattu erikseen ilmalla. Patruuna aseteltiin synteesikaavakkeessa venttiilien 5 ja 21 mahdollisimman lyhyillä teflonlinjoilla (Kuva 26). [^{18}F]Fluoridin eluointia varten aktivoitiin V21 ja juuri ennen eluentin syöttöä linjastoon aktivoitiin V5. Venttiili 5 kytkettiin aiemmin mainittu ulkoinen linja, jonka kautta oikea määrä eluointiin käytettävää liuosta työnnettiin patruunan läpi Hamilton ruiskun (100 μl) avulla. Eluentin perään työnnettiin 2 ml ilmaa 1 ml:n ruiskulla ja aktiivisuuden siirtymistä seurattiin sekä patruunan että R2 astian kylkeen kiinnitetyillä detektoreilla. Eluoinnin lopuksi inaktivoitiin V21 ja V5. Eluoinnissa ylläpidettiin hidas ja kontrolloitu eluointinopeus: noin 100-200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Eluointinopeutta pystyi silmämääräisesti seuraamaan tarkastelemalla patruunan läpikulkeutuvaa. Konsentroiduksen optimoinnin jälkeen optimoidussa radiosynteesissä käytettiin [^{18}F]fluoridin eluoinnissa 150 μl 0,9 % natriumkloridivesiliuosta (saliini). Toisena eluenttivaihtoehtona kokeiltiin kerran myös 0,9 % (m-%) natriumkloridiliuosta metanolissa.

Haihdutusta varten synteesikaavakkeeseen lisättiin kaasulinja R2 venttiili 13 kautta ja varopullo radioaktiivisuuden leviämistä estävän askariittipatruunan kanssa. Haihdutuksen ajaksi kaikki muut neulat irrotettiin R2:sta. Venttiili 13 kiinnitetty neula oli mahdollisimman pitkä, jotta argonkaasu yltäisi mahdollisimman lähelle neste pintaa (21 G x 3 1/6”, 0,8 x 80 mm). Varopullon linjassa oli riittävää pitkä lyhempää neulaa, sillä sen tarkoitus oli päästää ylipaine askariittiin. Lämmityslaitteen

lämpötila nostettiin haihdutuksen ajaksi maksimiin eli 99 °C:een. Samoin argonkaasuvirtaus nostettiin maksimiin (noin 90 ml/min). Haihdutuksessa kesti 45-50 minuuttia 150 µl:n saliiniliuoksen tilavuudella. Argonkaasuvirtaus pysäytettiin, kun reaktioastian pohjalla näkyi mahdollisimman pieni pisara (noin 20 µl).

Haihdutuksen jälkeen kaikki neulat irrotettiin reaktioastiasta ja [¹⁸F]fluoridisuolaliuoksen joukkoon pipetoitiin manuaalisesti seuraavat reaktioseoksen komponentit: 10 µl pyridatsiini-HCl-puskuria (pH 2.0) ja 100-300 nmol AMBF₃ prekursoria (liuotettuna DNA-laatuiseen ANC:ään, 317 mM). Reaktioseosta lämmitettiin lämmityslaitteessa 15 minuutin ajan 85 °C:ssa. Reaktioajan jälkeen reaktion eteneminen pysäytettiin lisäämällä 0,2 ml DNA-laatuiseen asetonitriliin ja veden (milli-Q) seosta (1:1). Tässä vaiheessa otettiin näyte laadunvarmistukseen (radio-TLC ja -HPLC) radiokemiallisen saannon selvittämistä varten. Reaktioastiaan liitettiin kaasulinja (V13) ja teflonlinja (V14) Alumina N patruunaan. Jälkimmäiseen teflonlinjaan kiinnitettiin mahdollisimman pitkä neula, joka ylttäisi reaktioastian pohjalle. Neula pidettiin kuitenkin vielä nestepinnan yläpuolella. Kaasulinjassa pidettiin saman pituinen neula kuin haihdutuksessa. Kaasuvirtaus pidettiin vielä kiinni.

Reaktioseoksen puhdistuksessa käytettiin Alumina N patruunaa (SepPak). Radioleimattu merkkiaine, [¹⁸F]1, eluoiitiin patruuna 1 ml:lla (1:1) etanoli:saliini liuksella ja vapaa [¹⁸F]fluoridi pidättäytyi patruunaan. Patruuna esikäsiteltiin radiosynteesiä varten 80 ml:lla vettä (milli-Q) ja 15 ml:lla EtAc:MeOH (9:1) eluentilla. Patruunan läpi työnnettiin lopuksi ilmaa. Alumina liitettiin synteesikaavakkeessa (Kuva 26) venttiilien 14 ja 15 väliin, jolloin systeemi oli auki patruunan kautta neljänteen jäteastiaan. Puhdistusta varten venttiili 14 ja R2:n välisen linjan neula työnnettiin mahdollisimman lähelle reaktioastian pohjaan niin, että seos työntyisi linjan kautta patruunaan. Seuraavaksi aktivoitiin venttiili 12 ja lisättiin kaasuvirtausta (20-40 ml/min). Tällöin reaktioseos siirtyi patruunan kautta jäte 4:een ja sekä radioleimattu prekursori että vapaa [¹⁸F]fluoridi pidättyivät patruunaan (seuranta patruunan ja jäteastian irrallisten detektorien avulla). Reaktioseoksen siirryttyä argon kaasuvirtaus pysäytettiin ja venttiili 12 inaktivoitiin. Seuraavaksi valmisteltiin puhdistus-eluentin valmistelu 1 ml:n ruiskuun (EtOH:saliini, 1:1). Merkkiaineen eluointia varten aktivoitiin ensin venttiili 15 ja sitten aktivoitiin venttiili 14, jolloin puhdistuseluventtiili työnnettiin venttiili 14 kiinnitetyn ulkoisen linjan kautta patruunaan ja siitä lopputuotepulloon. Merkkiaineen eluointia seurattiin patruunaan ja lopputuoteastiaan kiinnitettyjen detektorien avulla. Eluentin lisäyksen jälkeen linjastoon työnnettiin tarpeeksi ilmaa (noin 5-10 ml), jotta kaikki merkkiaine saatiin siirrettyä lopputuoteastiaan. Puhdistuksen lopuksi deaktivoitiin lopuksi venttiili 15 ja sitten venttiili 14.

Lopputuotteen kokonaisaktiivisuus mitattiin annoskalibraattorilla ja siitä otettiin näyte laadunvarmistusta varten. Laadunvarmistuksessa varmistettiin puhdistetun lopputuotteen radiokemiallinen puhtaus. Synteesin lopuksi mitattiin jäännösaktiivisuudet seuraavista astioista ja patruunoista: R1, R2, μ QMA ja Alumina N. Kaikki mitatut aktiivisuudet puoliintumisaikakorjattiin EOB:hen.

3.5 [^{18}F]2 radioleimaus

[^{18}F]AMBF₃-PEG₄-mTz ([^{18}F]2) radioleimaus suoritettiin tässä maisterintutkielmassa pääosin manuaalisesti. Poolittoman PEG-ketjun takia radioleimatun merkkiaineen puhdistusmenetelmää oli optimoitava eri patruunoilla kuin [^{18}F]1 puhdistuksessa.

[^{18}F]2 radioleimauksessa toimivat samat reaktio-olosuhteet ja reaktioajat kuin [^{18}F]1 radioleimauksessa. Radioleimauksissa vaihdeltiin kantajan ja prekursorin konsentraatiota sekä testattiin reaktioajan suhdetta saantoon (RCY, radiokemiallinen saanto). PEG-ketjullisen merkkiaineen tapauksessa reaktioajat pyrittiin pitämään mahdollisimman lyhyinä ja lämpötilaa ei nostettu korkeammaksi, sillä PEG-ketjulliset merkkiaineet tarttuvat helposti reaktioastian pohjalle ja reunoille liian korkeissa lämpötiloissa. Reaktioaikaa, kantajan määrää ja prekursorin konsentraatio verrattiin reaktioseoksen radiokemialliseen saantoon (yhdistetty RCY), joka määritettiin soveltuvalla radio-TLC menetelmällä. Radioleimatun prekursorin puhdistusmenetelmää optimoitaessa määritettiin myös eristetyn lopputuotteen radiokemiallinen puhtaus suhteessa reaktioseoksen lähtöaktiivisuuteen (eristetty RCY) ja tätä verrattiin vastaavan yhdistettyyn RCY:hyn.

Reaktioajan ja prekursorien konsentraation seuranta suoritettiin kuudella reaktioseoksella. Reaktiosarjojen aikapisteisiksi valittiin 10, 15 ja 20 minuuttia. Kutakin aikapistettä kohden suoritettiin kaksi reaktiota, joista toisessa oli 86,5 nmol (8,3 μ l 5,78 mM) prekursoria ja toisessa puolet vähemmän 43,25 nmol. Kantajan vaikutusta RCY:n testattiin neljän reaktion sarjalla, joista kahdessa prekursorin määrä pidettiin 86,5 nmol ja lopuissa 43,25 nmol. Kantajaa (KHF₂ 4 nM, 2 μ l) lisättiin näistä reaktioseoksista kahteen seokseen, joista toisessa oli suurempi määrä prekursoria ja toisessa pienempi. Koesarjojen otannat pidettiin aluksi kahdessa, jotta saatiin yleiskuva reaktioseosten käyttäytymisestä. Kolmas reaktiosarja suoritettiin näiden koesarjojen valossa parhaimmille otoksille. Radioleimaussynteesien optimointia päätettiin jatkaa käyttämällä reaktioaikana 15 minuuttia ja prekursorin määrä pidettiin 86,5 nmol:ssa ilman kantajaa, sillä kantajan lisääminen ei tuonut merkittävää lisäystä yhdistettyyn RCY:n. Kaikissa koesarjoissa Pyridatsiini-HCl-puskurin

määrä (10 μ l), reaktiolämpötila (85 °C) ja [^{18}F]fluoridin määrä (10 μ l) pidettiin samana kuin [^{18}F]1 radioleimauksissa. Näillä olosuhteilla reaktioseoksen radiokemiallinen saanto oli 56-67 %.

Reaktio-olosuhteiden optimoinnin jälkeen radioleimauksien toistojen yhteydessä testattiin kahta eri SPE-patruunamenetelmää radioleimatun tuotteen puhdistamiseen: C18 Light ja Silica Plus. C18 patruuna esivalmisteltiin 5 ml etanolilla ja 10 ml vettä (milli-Q), kun taas silica-patruuna esivalmisteltiin 80 ml vettä. Reaktioseos syötettiin reaktion päätteeksi patruunaan ja patruunaan pidähtynyt prekursori eluoiittiin ulos 1-3 ml:lla eluaattia. Molemmilla puhdistusmenetelmillä saavutettiin radiolääkeaineille vaadittu radiokemiallinen puhtaus eli yli 95 %.

Radiokemiallinen puhtaus määritettiin sekä radio-TLC:llä sekä radio- ja UV-detektorilla varustetulla HPLC:llä. HPLC:n ajo-ohjelmassa eluenteina käytettiin asetonitriilia ja vettä (milliQ), joihin oli lisätty 0,1 % (v/v) TFA:ta binaarisella gradientilla: 20 % (0,01 min) \rightarrow 35 % (20 min) \rightarrow 50 % (33 min) \rightarrow 20 % (35 min). Ajon pituus oli 35 minuuttia ja virtausnopeus 2,5 ml/min. HPLC:ssä käytettiin käänteisfaasikolonniina Kinetex 5 μ m C18 100 Å (250x10,0 mm). Ohutkerroslevykromatografiassa käytettiin normaalifaasimenetelmää ja ajoliuksena etyyliasetaatti:metanoli-seosta (9:1), johon oli lisätty 0,1 % (v-%) trifluorietikkahappo (TFA). Kuiva TLC-levy skannattiin FLA-skannerilla ja tulosten perusteella määritettiin RCP ja RCY.

3.6 [^{18}F]1 ja [^{18}F]2 lipofiilisyyden määrittäminen

Merkkiaineiden lipofiilisyyden määrittämiseen käytettiin niin sanottua *shake flask*-menetelmää, jossa seurattiin merkkiaineen jakautumista 1-oktanolin ja 0.02 M fosfaattipuskurin (pH 7.41) muodostamiin faaseihin.¹³⁶ Lipofiilisyyuskokeita varten merkkiaine puhdistettiin kaikista mittausta häiritsevistä radiokemiallisista epäpuhtauksista kullekin merkkiaineelle sopivalla metodilla (otsikot 3.4 ja 3.5). Merkkiaineiden radiokemiallinen puhtaus tarkistettiin radio-TLC- ja -HPLC-metodeilla (> 95 %).

Kahdeksaan polypropyleenisentrifuugiputkeen (15 ml) pipetoitiin 2 ml 1-oktanolia ja 2 ml 0.02 M fosfaattipuskuria (pH 7.41). Neljään putkeen pipetoitiin [^{18}F]1 (0.200 MBq, 1:1 EtOH:NaCl 0,9 m-%) ja loppuihin neljästä putkesta pipetoitiin [^{18}F]2 (0.176 MBq, 1:1 EtOH:NaCl 0,9 m-%). Putkia sekoitettiin huoneenlämmössä mekaanisesti 10 minuutin ajan, minkä jälkeen ne sentrifugoitiin (5 minuuttia, 1000 g). Lopuksi kustakin putkesta pipetoitiin valmiiksi punnittuihin nestetuikepulloihin

(5 ml) 0,5 ml oktanolifaasia ja 0,5 ml fosfaattipuskurifaasia. Pullojen radioaktiivisuudet mitattiin gammalaskurilla (engl. gamma counter, Wizard). Tulokset puoliintumisaikakorjattiin säteilytyksen loppuajankohtaan (EOB, end of bombardment) ja tarkat tilavuudet kussakin nestetuikepullossa määritettiin massaeron ja liuottimien tiheyksien avulla.

4 Tulokset ja yhteenveto

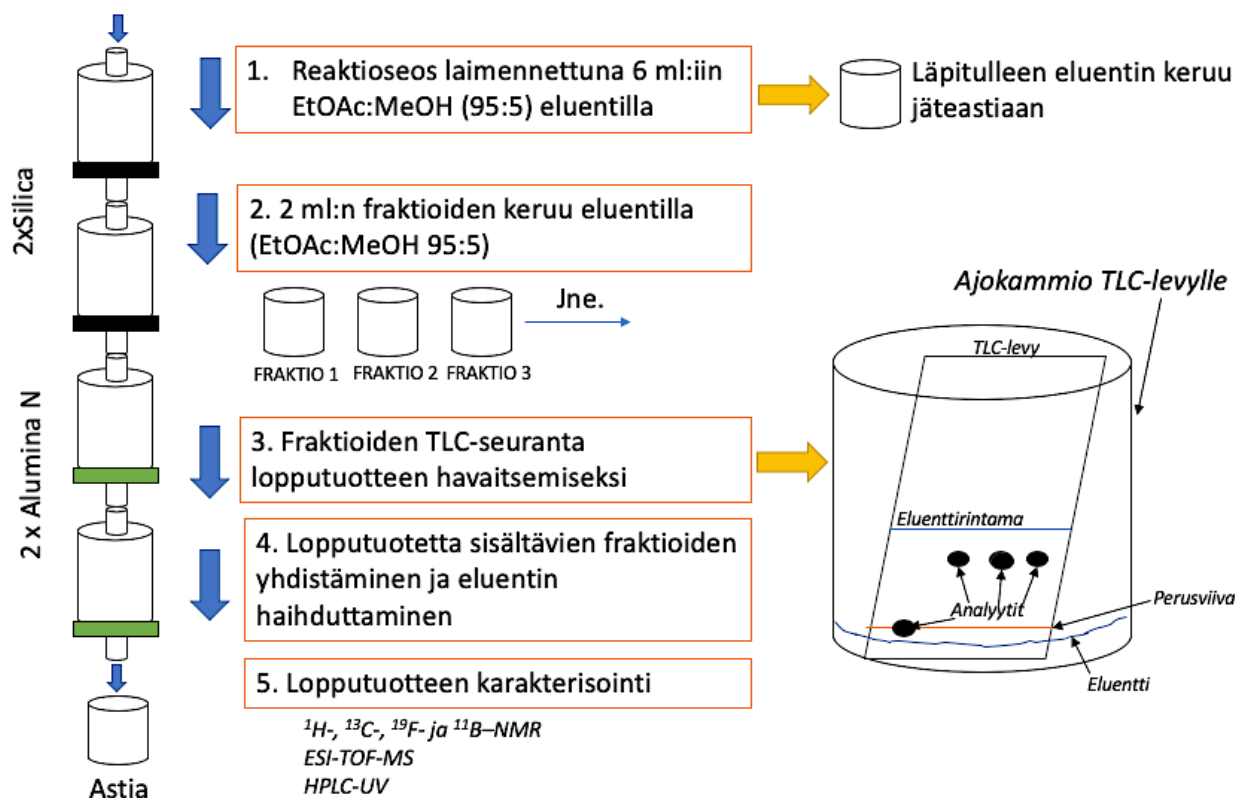
Tulosten yhteenveto aloitetaan prekursorien orgaanisesta synteesistä ja karakterisoinnista. Radiosynteesien osalta käydään läpi reaktio-olosuhteiden optimointi, karakterisointimenetelmät sekä menetelmien toistettavuus. Lopuksi määritetään prekursorien rasvaliukoisuustekijä.

4.1 Prekursorien orgaaninen synteesi

AMBF₃:n kaksivaiheisen orgaanisen synteesin ensimmäisessä reaktiovaiheessa radiosyntoni muodostettiin amiinialkylaation kanssa terminaalista amiinista ja jodimetyylibooripinakolaatista. Viimeisessä reaktiovaiheessa kahtaisionimainen trifluoriboraatti muodostetaan reaktiossa happaman kaliumbifluoridin ja välituotteen välillä. Välituotetta, AMBP_{in}, syntetisoitiin kerralla suurempi määrä (yli 100 mg). Lopputuotetta, AMBF₃, syntetisoitiin välituotteesta edelleen pienissä (20-25 mg) erissä, sillä lopputuotteen puhdistusmenetelmää oli vielä optimoitava.

Ensimmäinen reaktiovaihe oli arka vedelle, joten reaktioastiat kuumennettiin yön yli uunissa ja jäähdytettiin argonilla sekä reaktiossa käytettiin vedettömiä reagensseja (inerttejä). Viimeisessä reaktiovaiheessa käytettiin ainoastaan korkeampaa reaktiolämpötilaa ja lyhempää reaktioaikaa kuin Perrinin tutkimusryhmän julkaisussa. Reaktiota seurattiin samalla ohutlevykerroskromatografialla (TLC, värjättiin kaliumvetypermanaattivärjäysliuoksella). Perrinin tutkimusryhmä oli käyttänyt puhdistuksessa FLASH-kromatografiaa^{76,82}, mutta julkaisussa ei mainittu millä liuottimilla puhdistus suoritettiin. Kahtaisionina AMBF₃ liukenee erittäin hyvin asetonitriiliin ja veteen. Etyyliasetaatte oli normaalifaasipuhdistukseen paras mahdollinen pooliton liuotin, mutta yksinään se ei ollut tarpeeksi vahva liuotin erottamaan lopputuotetta paikallaan pysyvistä faasista. Metanolin ja etyyliasetaatin yhdistelmällä lopputuote eteni parhaiten normaalifaasi TLC-levyllä. Puhdistustesteissä käytettiin aluksi pitkään EtAc:MeOH-eluenttia suhteessa 9:1, mutta haihduttaessa lopputuotteen joukossa oli useaan otteeseen metanolin liuottamaa patruunamateriaalia (silikaa). Koska kyseinen ilmiö toistui usein, siirryttiin käyttämään metanolia ja etyyliasetaatte suhteessa 5:95. Jos metanolia on enemmän kuin 10 tilavuusprosenttia läsnä, puhdistuksessa liukenee silikaa herkemmin kolonnista. Laskemalla

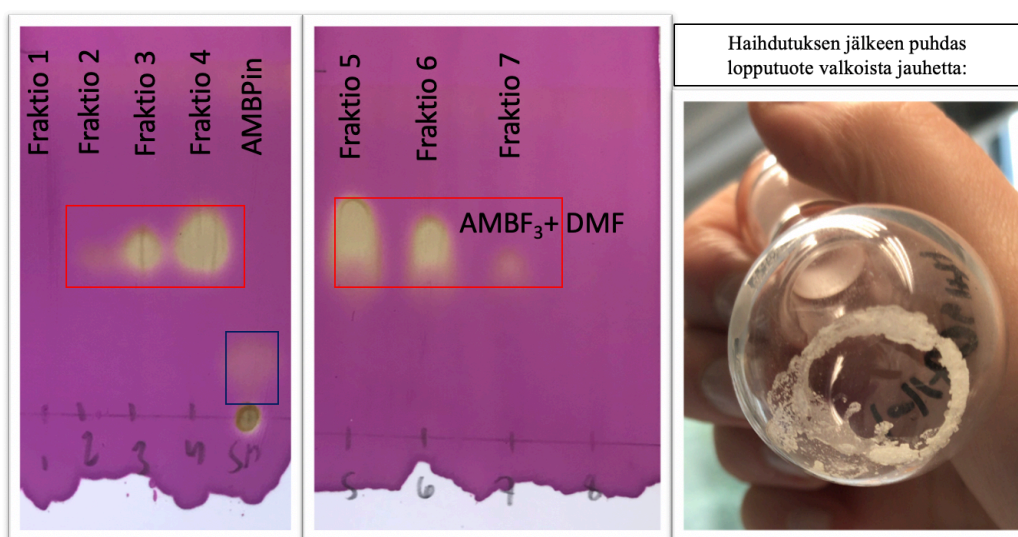
metanolin tilavuusprosenttiosuus eluentissa 5 %:iin ei lopputuotteen joukkoon enää päätenyt epäpuhtautena silikaa. Uudelleenkiteytys toimii todennäköisesti trifluoriboraattisuolojen puhdistukseen paremmin kuin FLASH-kromatografia.



Kuva 27. AMBF₃:n optimoidun SPE-patruunapuhdistuksen käytännön toteutus.

Puhdistusmenetelmä optimoitiin SPE-patruunoiden avulla soveltaen FLASH-kromatografia-puhdistuksen periaatteita (Kuva 27). Patruunamateriaali valittiin sen perusteella siten, miten tuote oli erottunut TLC-kokeissa ja mikä materiaali pidättäisi parhaiten vapaan fluorin. Aluksi puhdistuskokeissa käytettiin vain yhtä Alumina N patruunaa. Koska puhdistuksen jälkeen kerätyissä fraktioissa ^{19}F -NMR:ssä havaittiin edelleen epäpuhtautena vapaata fluoria, päädyttiin lisäämään patruunojen määrää. Ensimmäisenä kokeiltiin Plus Silica- ja Alumina N-patruunan yhdistelmää, mutta vapaata fluoria oli edelleen havaittavissa. Lopulta puhdistusta kokeiltiin yhdistämällä molempia patruunoita kaksi peräkkäin (neljän patruunan jono, ensin silica ja viimeisinä alumina N), jolloin onnistuttiin lopulta saamaan puhdasta AMBF₃-prekursoria ilman vapaata fluoria. Puhdistuksessa oli erittäin tärkeää esivalmistella patruunat huolellisesti ja suorittaa eluointi sopivalla eluointinopeudella, jotta patruunan materiaali ei työntynyt eluentin mukana ulos patruunasta lopputuotteen joukkoon. Tämän puhdistusmenetelmän avulla reaktioseoksen DMF:stä ei kuitenkaan päästy eroon, minkä takia

haihdutus vaati korkean vakuumin ja lämpötilan. Haihdutuksessa oli käytettävä haihdutuslaitetta (3.2 Menetelmät ja materiaalit), joka loi tarpeeksi korkean vakuumin DMF:n haihtumiseen. Yleensä käänteisfaasipatruunoilla DMF pystytään erottamaan poolittomista molekyyleistä. AMBF_3 on molekyylirakenteeltaan hyvin samankaltainen kuin dimetyyliformamidi, minkä takia ne eivät erottuneet puhdistuksessa erillisiin fraktioihin (Kuva 28). Tällä metodilla päästiin saman suuruiseen saantoon kuin Perrinin ryhmän julkaisussa⁸²: 223 μmol AMBP:n määrällä AMBF_3 :n saanto oli 21,2 mg (94,6 μmol , 57.6 %).



Kuva 28. AMBF_3 fraktioissa 3-7 TLC:llä synteesituotteen puhdistusvaiheessa. Silika-TLC levyt on värjätty kaliumpermanganaatti liuoksella tuotteen havaitsemisen helpottamiseksi. Lopputuotteena saatiin SPE-patruunapuhdistuksen jälkeen valkoista jauhetta 26 mg.

Prosentuaalista kemiallista puhtautta AMBF_3 :lle ei voitu määrittää, sillä rakenteen kolmoissidos ei tuottanut näkyvää UV-signaalia UV-HPLC-analyysissä. Radioleimattu tuote kuitenkin tuotti radiosignaalin samaisella HPLC-metodilla. Keräinjisointi radioleimatulla ja kylmällä prekursorilla ei kuitenkaan auttanut UV-signaalin havaitsemisessa.

AMBF_3 -PEG₄-mTz synteesi oli suoraviivainen jatkoreaktio AMBF_3 käyttöön prosteettisena ryhmänä. Reaktion kannalta on kiinnitettävä ainoastaan huomiota lähtöaineiden ekvivalenttisuhteisiin: AMBF_3 :sta lisätään reaktioseokseen 5 ekvivalenttia ja mTz-PEG₄-atsidia 1 ekvivalentti. Atsidi on siis reaktion rajoittava tekijä. Reaktioseoksen komponentit pipetoitiin samaan pyörökolviin ja sekoitettiin lämpimässä vesihauteessa kahden tunnin ajan. Lopputuote puhdistettiin C18-patruunoilla käyttämällä asetonitrili:vesi eluenttia. Saanto oli 62,5 % ja LC-MS reaktionmonitorointi ajossa havaittiin lähtöaineena käytettyä atsidia olevan jäljellä. Synteesissä pystyttiin noudattamaan pitkälti Liun väitöstutkielmassa¹³³ julkaistua synteesiä.

4.1.1 Prekursorien karakterisointi

Prekursorien karakterisoinnissa käytettiin ydinmagneettista resonanssia (NMR, Nuclear Magnetic Resonance), ohutlevykerroskromatografiaa (TLC) ja korkeanerotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC). AMBF₃ karakterisoitiin ¹H-, ¹³C-, ¹¹B- ja ¹⁹F NMR:llä, kun taas AMBF₃-PEG₄-mTz:lle vähäisen saannon vuoksi karakterisointi tehtiin ¹⁹F ja ¹H NMR sekä LC-MS avulla. Lisäksi merkkiaineista ajettiin massaspektrianalyysi ESI-ToF-MS:llä.

<p>¹H NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>H2a-b: 4,07 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 2H)</p> <p>H1, R1a-b: 3,06 (s, 7H),</p> <p>H3a-b: 2,44 (s, 2H)</p> <p>¹³C NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>2: 80,96</p> <p>1: 73,51</p> <p>3: 57,22</p> <p>4a-b: 53,42</p> <p>¹¹B NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>2,22-1,05 (q, 1B)</p> <p>¹⁹F NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>-139,07 (3 F, dd, <i>J</i> = 99,2, 49,2 Hz)</p>	<p>¹H NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>H2a-2b: 4,89 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 2H)</p> <p>H1, R1a-b ja H3a-b: 3,60 (d, <i>J</i> = 4.5 Hz, 9H)</p> <p>R2a-b ja R3a-b: 1,32 (s, 12H)</p> <p>¹³C NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>6 ja 7: 86,80</p> <p>2: 82,67</p> <p>1: 72,22</p> <p>5: 60,00</p> <p>3: 57,80</p> <p>4a-b: 54,07</p> <p>8a-b ja 9a-b: 24,90</p> <p>¹¹B NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>30,24 (s, 1B)</p>	<p>¹H NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>H2a-b: 3,20 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 2H)</p> <p>H1: 2,45 (t, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H)</p> <p>R1a-b: 2,20 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 7H)</p> <p>¹³C NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>2: 80,10</p> <p>1: 74,08</p> <p>3: 48,05</p> <p>4a-b: 44,14</p>	<p>¹H NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>H1a-b: 2,18 (s, 2 H)</p> <p>R1a-b ja R2a-b: 1,26 (s, 12 H)</p> <p>¹³C NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>2 ja 3: 84,04</p> <p>4a-b ja 5a-b: 23,76</p> <p>¹¹B NMR, siirtymät (δ, ppm):</p> <p>31,69 (s, 1B)</p> <p>22,36</p>

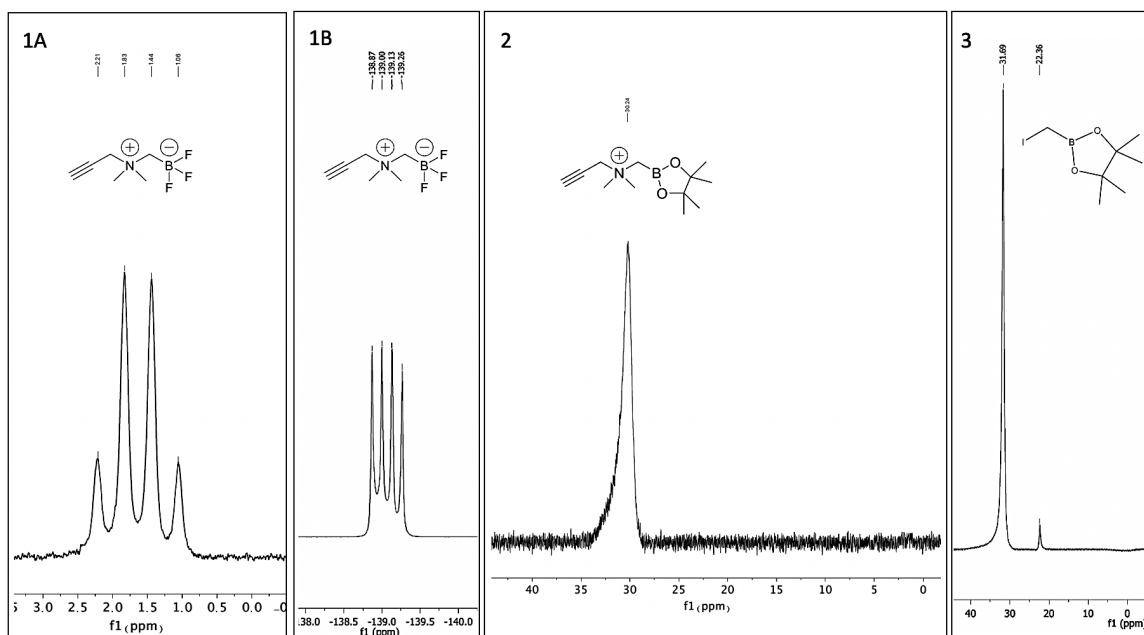
Kuva 29. AMBF₃:n NMR karakterisoinnin analyysi. (1) AMBF₃:n ¹H-, ¹³C-, ¹¹B- ja ¹⁹F-NMR, (2) AMBP:n välituotteen ¹H-, ¹³C- ja ¹¹B-NMR, (3) lähtöaineen N,N-dimetyyliprop-2-ynyl-1-amiinin ¹H- ja ¹³C-NMR spektri ja (4) lähtöaineen IBPin ¹H-, ¹³C- ja ¹¹B-NMR spektrin piikkien analyysi.

Kuvassa 29 on esitetty AMBF₃ ja sen synteesin olennaisten lähtöaineiden NMR-spektrien analyysit. Protonin lisäksi ¹³C-NMR spektristä pystyttiin tunnistamaan kaikki hiilet. ¹¹B- ja ¹⁹F-NMR olivat tärkeitä trifluoriboraattiryhmän karakterisoinnissa. AMBF₃:n karakterisointi tulokset vastasivat Perrinin tutkimusryhmän julkaisemia¹³⁷ NMR spektrien osalta. Heidän julkaisemassa ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN) spektrissä havaittiin seuraavat siirtymät δ (ppm): 4.10 (d, 2H, *J* = 3 Hz), 3.08– 3.10 (m, 7H), 2.45 (leveä, 2H). ¹H-NMR spektrissä (Liite 4) tunnistettiin kolme molekyylille olennaista siirtymää, jotka vastasivat myös julkaistua NMR spektriä ja ennusteita: 4,07 ppm dupletti vetyatomeille H2a ja H2b (integraali 2), voimakas singletti 3,06 ppm vetyatomeille H1 ja R1a-b (integraali 7) ja leveä piikki 2,44 ppm siirtymällä vastaa vetyatomeja H3a-b (integraali 2).

Perrinin tutkimusryhmän julkaisemassa¹³⁷ ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) spektrissä havaittiin seuraavat siirtymät δ (ppm): 81.07, 73.62, 57.32, 53.49. Samat siirtymät löydettiin ^{13}C -NMR spektristä (Liite 5). Tunnistetut piikit on merkitty kuvaan 29. Hiiliatomi 5 piikkiä ei voida havaita, sillä neliarvoiseen booriin sitoutuneena sen on liian leveä erottuakseen spektristä. Tämän takia myös ^1H -NMR spektrissä vastaavan hiiliatomin vetyatomien signaali ($\text{H}_{3\text{a-b}}$) havaitaan leveänä piikkinä.

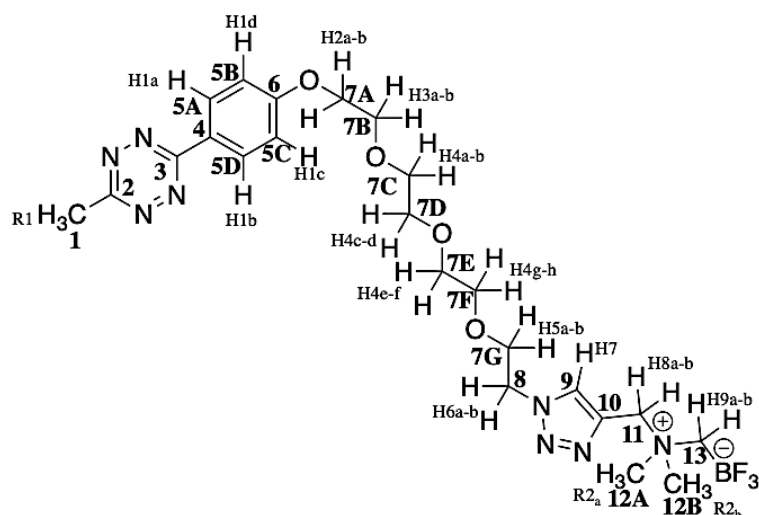
Välituotteen, AMBP:n, osalta ^1H -NMR (Liite 1) vastasi myös Perrinin tutkimusryhmän julkaisua. Protoneille $\text{H}_{2\text{a-b}}$ tunnistettiin dupletti 4,89 ppm siirtymän kohdalla. Siirtymällä 3,60 ppm havaittiin dupletti, jonka integraali vastasi yhdeksää protonia. Tämä signaali vastaa protoneita H_1 , $\text{R}_{1\text{a-b}}$ sekä $\text{H}_{3\text{a-b}}$. Tämänkään molekyylin ^{13}C -NMR spektriä ei ole julkaistu (Liite 2). Spektristä tunnistettiin signaalit kullekin hiiliatomille seuraavasti: sekä hiiliatomit 6 että 7 siirtymällä 86,80 ppm, hiiliatomi 2 siirtymällä 82,67 ppm, hiiliatomi 1 siirtymällä 72,22 ppm, hiiliatomi 5 siirtymällä 60,00 ppm, hiiliatomi 3 siirtymällä 57,80 ppm, hiiliatomit 4a-b siirtymällä 54,07 ppm ja sekä 8a-b että 9a-b siirtymällä 24,90 ppm. Pinakolirengas on tunnistettavissa hiili- ja protonispektrissä siirtymillä 24,90 ppm (^{13}C) ja 1,32 ppm (^1H). Lisäksi pinakolirengas pystytään booriatomin avulla karakterisoimaan ^{11}B -NMR:n avulla (Liite 3).

Pinakolirenkaan booriatomin aiheuttaman signaalin siirtymä AMBP:n välituotteen ^{11}B -NMR spektrissä (Kuva 30, 2) on sama kuin lähtöaineen, IBP:n, aineen vastaavassa spektrissä (Kuva 30, 3). AMBF_3 :n trifluoriboraattifunktionalisuuden karakterisointi on havainnollistettu kuvassa ^{11}B - (Kuva 30, 1A) ja ^{19}F -NMR (Kuva 30, 1B) spektreillä. Näihin karakterisointimenetelmiin päädyttiin, koska trifluoriboraattiyhdisteiden solvolyyysiä on tutkittu yleisimmin ^{19}F - ja ^{11}B -NMR:n avulla.^{81,137} Kuvien spektrit löytyvät liitteistä 3, 7 ja 16. Trifluoriboraattifunktionaalisuus näkyy molemmissa spektreissä kvartetina: fluori-19 tapauksessa BF_4^- rakenteiden signaalit esiintyvät -139 ppm paikkeilla ja boori-11 vastaavien rakenteiden signaalit esiintyvät lähempänä 0 ppm tai sen negatiivisten lukemien puolelta (AMBF_3 :n tapauksessa 1-2 ppm alueella). ^{11}B -NMR spektrin signaalin muoto johtuu booriatomin kytkeytymisestä kolmeen fluoriatomiin.¹³⁹ Tämän takia AMBF_3 boori-11 signaalia ei havaita yhtenä piikkinä, kuten AMBP:n tai BP:n spektrien tapauksessa. ^{11}B -NMR spektreissä oli havaittavissa boorisignaalien lähettävillä leveitä signaaleja, mikä on NMR-putken borosilikaattilasien aiheuttamaa. Sitä esiintyy ^{11}B -NMR-karakterisoinnissa usein ja sen takia spektrejä pitää muokata analysointia varten. AMBF_3 :n ^{19}F - ja ^{11}B -NMR siirtymät vastaavat myös Perrinin tutkimusryhmän julkaisemien¹³⁷ spektrien siirtymiä: ^{11}B NMR (96 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 1.57; ^{19}F NMR (282 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 139.16 (1:1:1:1, $J = 54$ Hz).



Kuva 30. ^{11}B -NMR spektrien vertailu. AMBF_3 ^{11}B -NMR (1A) kvartettsignaalin muoto muistuttaa sen ^{19}F -NMR signaalin muotoa (1B), sillä booriatomi on kytkeytynyt kovalenttisesti kolmeen fluoriatomiin. BPin (3) ja AMBPIn (2) ^{11}B -NMR spektrissä booriatomin aiheuttamat signaalit ovat singlettejä.

$\text{AMBF}_3\text{-PEG}_4\text{-mTz}$ (liite 9 ja Kuva 31) orgaaninen synteesi toistettiin tutkimusharjoittelun aikarajan puitteissa vain kerran vajaan 2 mg (63 %) saannolla, mikä oli riittävä ^1H - ja ^{19}F -NMR karakterisointiin. Koska muita NMR karakterisointeja ei tehty, ajettiin lähtöaineelle, $\text{PEG}_4\text{-mTz}$ -atsidille (Liite 10 ja Kuva 31), ^{13}C - ja ^1H -NMR vertailun vuoksi. Yhdisteiden rakenteiden tärkeimmät piikit on eritelty kuvassa 31. $\text{AMBF}_3\text{-PEG}_4\text{-mTz}$:n aromaattisen renkaan vetyjen (H1a-b) multiplettien singletit ovat havaittavissa 7.14-7.18 ppm ja 8.45-8.50 ppm alueella. Singletti signaali, 8.12 ppm, aromaattisten vetyjen välillä kuuluu yksittäiselle vetyatomille, H7. PEGyloidun ketjun vedyt esiintyvät spektrissä 3.5-4.5 ppm siirtymäalueella multipletti signaaleina kahta vetyatomia edustavalla integraalilla (H2a-b, H3a-b, H4g-h, H5a-b ja H6a-b) tai kuuden vetyatomien integraalilla (H4a-f). Vetyatomit 8a-b esiintyvät samalla alueella 4.46 ppm kohdalla kahden vetyatomien integraalilla singlettinä. Metyyliryhmien vedyt, R1 ja R2a-b, näkyvät NMR-spektrillä duplettia muistuttavana signaalina 2.97-2.99 ppm kohdalla, jonka integraali vastaa 9 protonia. Signaalien kuuluisi olla erillisiä singlettejä, mutta niiden siirtymien ollessa niin lähellä toisiaan niiden resoluutio ei ole riittävä. Tämän takia signaalit eivät ole erottuneet toisistaan vaan ne ovat menneet osittain päällekkäin. Tähän ilmiöön voi olla vaikutusta muun muassa käytetyllä liuottimella tai ajon skannausten määrällä. ^1H -NMR analyysissä liuottimena käytettiin deutoitua asetonitriliä, kun taas lähtöaineen analyysissä deutoitua kloroformia.

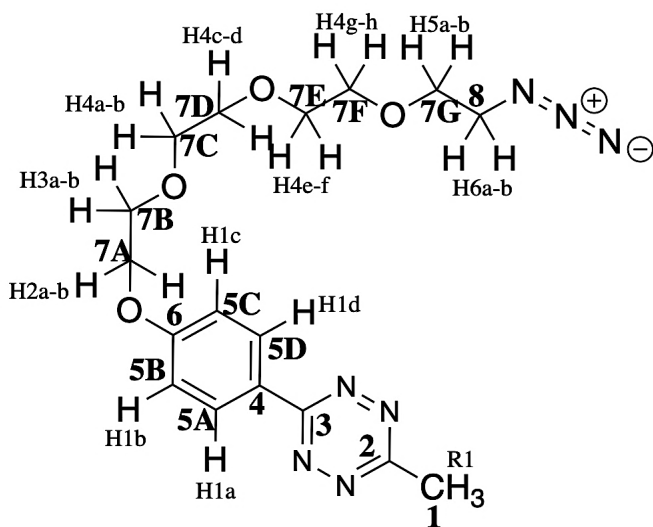


¹H NMR, δ(ppm):

2.30 ppm (2 H, b, H9a-b)
 2.98 ppm (9 H, d, *J* = 9.3, R2a-b & R1)
 3.52-3.60 ppm (6 H, m, H4a-f)
 3.61-3.67 ppm (2 H, m, H4g-h)
 3.80-3.89 ppm (4 H, m, H5-6a-b)
 4.21-4.26 ppm (2 H, m, H3a-b)
 4.46 ppm (2 H, s, H8a-b)
 4.52-4.57 (2 H, m, H2a-b)
 7.14-7.18 ppm (2 H, m, H1c-d)
 8.12 ppm (1 H, s, H7)
 8.45-8.50 ppm (2 H, m, H1a-b)

¹⁹F NMR:

-138.38 (3F, dd, *J* = 93.9, 49.2 Hz)



¹H NMR, δ(ppm):

8.57 – 8.50 (m, 2H, H1a ja H1d)
 7.10 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H1b ja H1c)
 4.28 – 4.21 (m, 2H, H2a-b)
 3.95 – 3.88 (m, 2H, H6a-b)
 3.80 – 3.71 (m, 2H, H5a-b)
 3.71 – 3.64 (m, 8H, H4a-h)
 3.38 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H3a-b)
 3.06 (s, 3H, R1)

¹³C NMR δ(ppm):

166,75 (2)
 163,91 (3)
 162,67 (6)
 129,84 (4)
 124,46 (5A ja 5D)
 115,43 (5B ja 5C)
 70,88 (7C-E)
 70,21 (7F)
 69,74 (7B ja 7G)
 67,82 (7A)
 50,84 (8)
 21,21 (1)

Kuva 31. AMBF₃-PEG₄-mTz NMR analyysit. Ylempässä kuvassa on eritelty AMBF₃-PEG₄-mTz ¹H- ja ¹⁹F-NMR spektrien karakterisointi. Alemmassa kuvassa on puolestaan lähtöaineen, PEG₄-mTz-atsidin, ¹H- ja ¹³C-NMR analyysi.

Molemmista prekursoreista ajettiin ESI-TOF-MS-analyysi positiivisella ionisaatiolla (Liite 8 ja 11). Perrin et al. (2014) on julkaissut massaspektrometria tulokset AMBF₃:lle ESI- ja HRMS-tuloksina.⁷⁶ He havaitsivat AMBF₃:n ESI-MS:sta [M-F]⁺ adduktin m/z-arvoksi 136,1 (laskennallinen 135,09) ja HRMS:sta [M]⁺ m/z-arvoksi 187,0871 (laskennallinen 187,0872). AMBF₃:n karakterisointi massaspektrometrian avulla osoittautui haasteelliseksi johtuen mahdollisesti molekyylin pienestä koosta ja kahtaisionin ionisaatiosta. Liitteestä 8 havaittiin kuitenkin [M-F]⁺ ja [2M+Na]⁺ adduktien

laskennallisia m/z -arvoja vastaavat piikit. AMBF₃-PEG₄-mTz:n ESI-TOF-MS:stä puolestaan havaittiin $[M-F]^+$ ja $[M+Na]^+$ laskennallisia m/z -arvoja vastaavat piikit (Liite 11).

4.2 [¹⁸F]1:n radiosynteesi

Merkkiaineen [¹⁸F]1 radiosynteesin kannalta kaksi kriittisintä vaihetta ovat [¹⁸F]fluoridin pidäytyminen μ QMA-patruunaan ja pidäytyneen aktiivisuuden eluointi mahdollisimman pienellä määrällä 0,9 % NaCl liuosta eli konsentrointi mahdollisimman pieneen tilavuuteen (50-70 μ l). Isotooppisen vaihtumisreaktion kannalta merkkiaineen molaarinen aktiivisuus on pienempi kuin nukleofiilisissa radiofluorausreaktioissa. Stabiilin fluori-19 isotoopin kilpaillessa vaihdosreaktiossa radioaktiivisen nuklidin kanssa molaarinen aktiivisuus laskee eikä radiokemiallisilta saannoilta odoteta suuria määriä. Tutkimuksissa on kuitenkin osoitettu, että isotooppisen vaihdosreaktion saanto on riippuvainen reaktioseoksen kokonaistilavuudesta: mitä pienempi tilavuus, sitä parempi on radiokemiallinen saanto. Manuaalisesti tehdyissä radioleimauksissa saavutettiin yli 90 % radiokemiallinen saanto, kun reaktioseoksen kokonaistilavuus pidettiin 25 μ l:ssa.

Fluori-18 pidäytyminen patruunaan on riippuvainen eluointinopeudesta. PS-HCO₃-patruuna toimi hyvänä vaihtoehtona fluori-18 konsentroimisessa, mutta sitä käytettäessä eluointi suuremmalla määrällä suolaliuosta (150-200 μ l). Kyseistä patruunaa käytettäessä eluointi on tehtävä mahdollisimman hitaasti, jotta patruunaan pidäytynyt fluori-18 saatiin eluotua sieltä pois. Vaikka eluointi tehtiin hitaasti, PS-HCO₃-patruuna sitoi [¹⁸F]fluoridin voimakkaammin kuin μ QMA-patruuna. Kaupallinen μ QMA osoittautui näiden kokeiden perusteella parhaimmaksi vaihtoehdoksi fluori-18 konsentroidin kannalta, joten sen käyttöä automatisoidussa synteesissä jatkettiin tässä työssä.

[¹⁸F]Fluoridin konsentrointi kaupallisella μ QMA-patruunalla suoritettiin kolmella eri eluointi-tilavuudella: 50, 70 ja 100 μ l saliinilla. Lopulta tutkielmatyön loppupuolella optimoinnissa päädyttiin käyttämään 150-200 μ l eluutiotilavuutta, joka edelleen konsentrointiin vastaamaan 10-20 μ l kokoista pisaraa haihduttamalla lämmittäen ja argonkaasuvirralla. Patruuna esikäsiteltiin 3 ml kylläisellä suolaliuksella ja 3 ml vedellä (milli-Q) ennen uutta radioleimausta. Perrinin tutkimusryhmän⁸² mukaan yhtä patruunaa voidaan käyttää kymmenen kertaa, minkä jälkeen patruunan kyky pidättää kohtioveden [¹⁸F]fluoridia laskee merkittävästi. Lisäksi he raportoivat μ QMA:han pidäytyvän tuotetusta lähtöaktiivisuudesta 95 %. Nämä seikat havaittiin myös tässä tutkielmatyössä (patruunan pidäytyvän [¹⁸F]fluoridin osuus lähtöaktiivisuudesta $95,11 \pm 3,46$ %, $n = 12$).

[¹⁸F]Fluoridin konsentrointi haluttiin optimoida synteisyksikköön sopivaksi siten, että eluointi voitaisiin tehdä pienellä volyymillä ulkoisen linjan kautta. Patruunaa ei voitu asentaa annoskalibraattoriin, kuten normaali QMA-patruunan kanssa voidaan tehdä, sillä µQMA-patruuna vuosi suuren paineen vaikutuksesta. Tämän takia patruuna asetettiin kahden venttiilin väliin lyhyillä teflonlinjoilla ja kohtiovesi siirrettiin kohtioltta synteisyksikön sisällä olevaan varopulloon, mistä edelleen se kuljetettiin patruunan läpi synteisyksikköön asennetun automaattiruiskun avulla. Tämän jälkeen [¹⁸F]fluoridi eluointiin reaktioastiaan haihdutusta varten. Näiden toimien avulla patruuna ei vuotanut ollenkaan.

Eluointitesteissä huomattiin, että eluointi näissä olosuhteissa vaatii työskentelijältä harjaantumista, kärsivällisyyttä ja huolellista eluointitekniikkaa. Ulkoisen linjan pituus ja eluentin pieni tilavuus tekivät eluoinnista haastavaa, sillä nestepatsaan etenemistä linjastossa ei voinut seurata riittävästi. Eluoinnissa pyrittiin noudattamaan Perrinin tutkimusryhmän julkaisemaa eluointinopeutta⁸² (200 µl/min) ja seuraamaan patruunassa näkyvien nestekuplien liikettä tarkastelemalla samalla sekä patruunaan että reaktioastiaan kiinnitettyjä synteisyksikön suhteellista radioaktiivisuutta mittaavia detektoreita. Eluointitestien tuloksissa havaittiin suurta vaihtelua eluointitilavuuksilla 50-100 µl. Siirryttäessä suurempiin eluointitilavuuksiin eluointitehokkuuden keskihajonta pieneni ja eluoinnista tuli toistettavampi. Taulukossa 6 on esitetty kutakin eluointitilavuutta vastaavan eluointitehokkuuden keskiarvo keskihajontoineen.

Taulukko 6.[¹⁸F]Fluoridin konsentroidin optimointi µQMA-patruunasta.

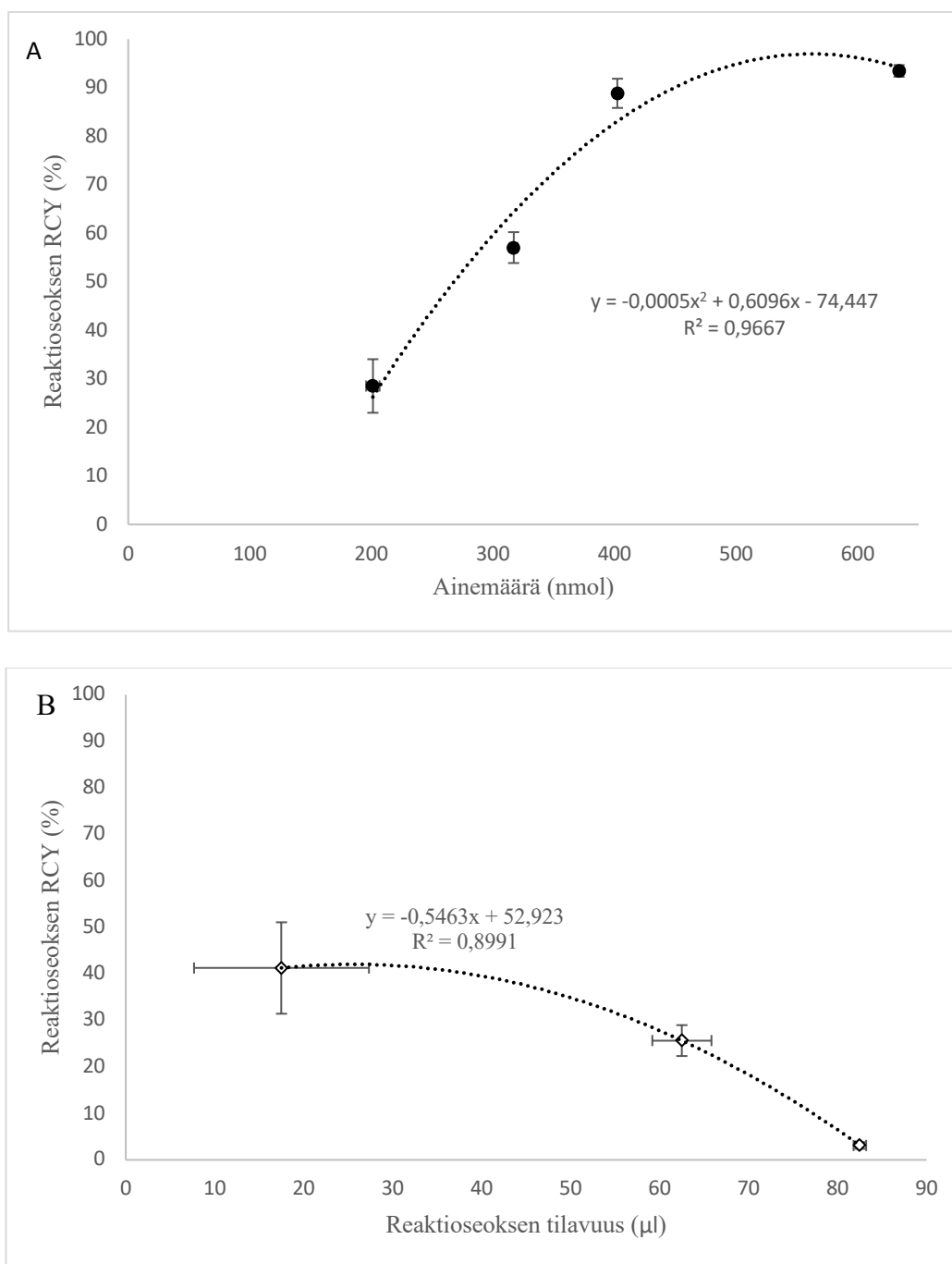
Eluointitilavuus (µl)	Eluointitehokkuus (%)	Otoskoko (n)
50	39,94 ± 13,15	6
70	65,84 ± 21,07	4
100	43,02 ± 22,01	3
150	71,54 ± 5,80	4

[¹⁸F]Fluoridin konsentroidinnissa testattiin myös patruunan kuivauksen vaikutusta eluointitehokkuuteen. Tämä testi suoritettiin 50 ja 70 µl tilavuuksilla kolmen testin avulla: yksi eluointikerta ilman argonkaasuvirtausta, lyhyt kuivaus argonkaasuvirralla 30 sekunnin ajan ja pidempi argonkaasuvirtaus kahden minuutin ajan. Eluointitulokset on esitetty taulukossa 7. Tuloksista havaittiin, että eluointi on tehokkainta märällä patruunalla ja heikointa kuivalla patruunalla.

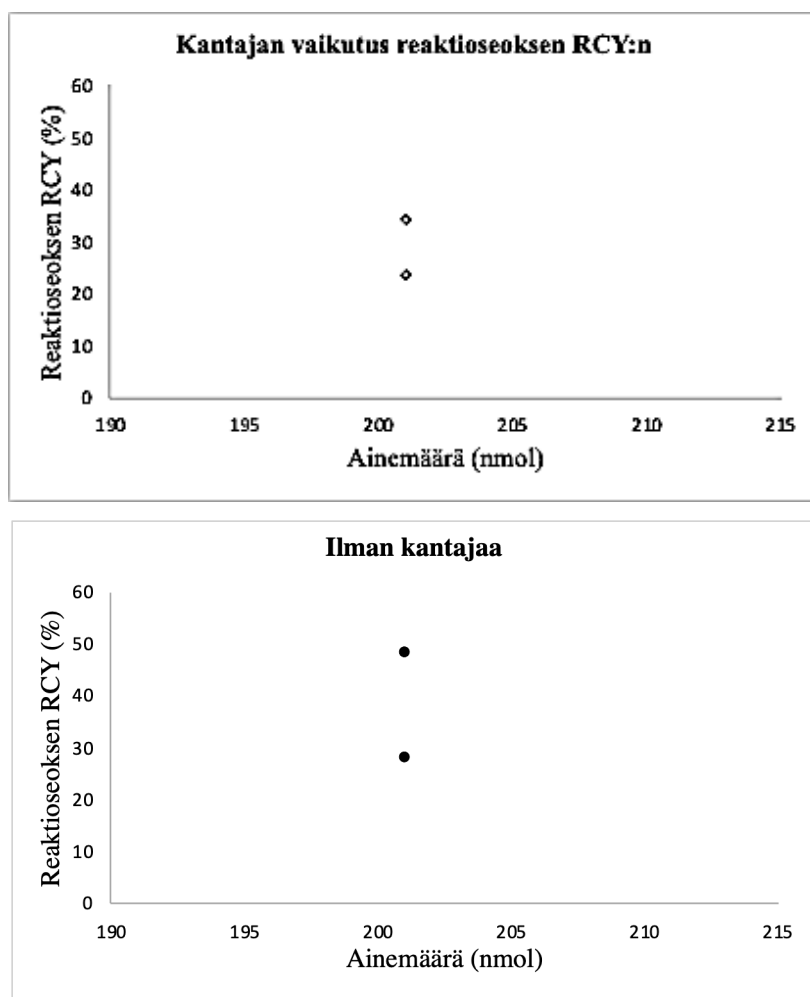
Taulukko 7. Eluointitehokkuus argonkaasulla kuivatulla ja märällä μ QMA-patruunalla.

$V_{NaCl\ 0,9\%}(\mu l)$	Kaasuvirtauksen pituus (s)	Patruunan [^{18}F]fluoridi (%)	Eluoitu [^{18}F]fluoridi (%)
50	-	87	35,8
50	30	95,2	33,7
50	120	97,6	18,30
70	-	97,3	96,21
70	30	95,97	48,37
70	120	97,3	56,18

[^{18}F]1:n radioleimausolosuhteiden määrittämisessä tarkkailtiin prekursorin ainemäärän (Kuva 32, A) sekä reaktioseoksen kokonaistilavuuden suuruutta (Kuva 32, B) joko kantajan kanssa tai ilman (Kuva 33). Pyridatsiini-suolahappo-puskuriliuoksen määrän, reaktiolämpötilan ja -ajan suhteen ei ylimääräisiä optimointeja tarvinnut tehdä, sillä näillä määrillä päästiin yli 25 %:n reaktioseoksen radiokemiallisessa saannossa. Kuvassa 32 on esitetty reaktioseoksen kokonaistilavuuden ja prekursorin ainemäärän vaikutus reaktioseoksen radiokemialliseen saantoon. Kuvaajien perusteella voidaan havaita, että korkean radiokemiallisen saannon takaamiseksi reaktioseoksen tilavuus on pidettävä niin pienenä kuin mahdollista ja prekursorin määrää kasvattaa. Lisäksi havaittiin, ettei kantajan lisääminen lisännyt saantoa merkittävästi (Kuva 33). Useammissa testeissä kantajan lisääminen antoi välillä paremman saannon ja välillä huonomman. Kantajan lisäystä ei enää jatkettu myöhemmissä optimoinneissa, sillä molaarinen aktiivisuus haluttiin pitää mahdollisimman korkeana ja ylimääräinen lisäys fluoria laskee isotooppisen vaihdosfluoraukseen liittyvää alhaista molaarista aktiivisuutta jo entisestään.



Kuva 32. Radiokemialliseen saantoihin vaikuttavat tekijät. AMBF₃ prekursorin ainemäärä RCY:n funktiona, kun reaktioseoksen kokonaistilavuus pidettiin vakiona ($V = 25 \mu\text{l}$) (A) ja reaktioseoksen kokonaistilavuus (B) reaktioseoksen RCY:n funktiona, kun AMBF₃ prekursorin ainemäärä pidettiin vakiona ($0,2 \mu\text{mol}$) .



Kuva 33. Kantajan (KHF_2 , 8 nmol) vaikutus RCY:n AMBF_3 prekursorin ainemäärän funktiona.

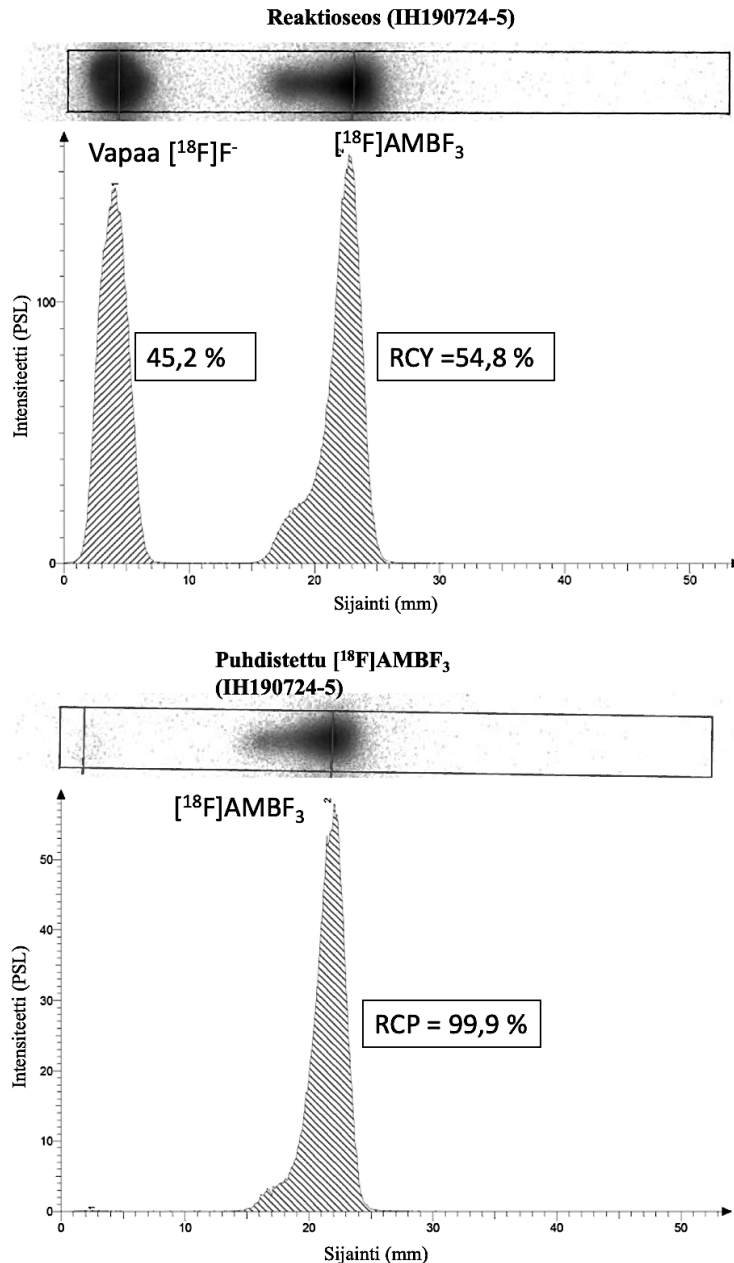
Tulosten analysoinnissa tarkasteltiin myös suolakonsentraation muutoksen vaikutusta radiokemiallisen saanton haihduttamisen yhteydessä. Reaktioseoksessa eluoidun saliniliuoksen konsentraatio on 0,9 m-% 150 μl :ssa. Haihdutuksen jälkeen konsentraatio muuttuu 0,12 m-% 20 μl :ssa. Tämä ei vaikuttanut ^{18}F :n RCY:n. Suolakonsentraation muutoksen vaikutusta olisi tarkkailtava suuremmilla konsentraatiomuutoksilla. Tässä työssä konsentraatiomuutokset optimoinnissa olivat pieniä, ettei niiden pohjalta vaikutussuhdetta voinut tarpeeksi analysoida.

^{18}F Fluoridin haastavan konsentroidin vuoksi radioleimauksen optimointia jatkettiin eluomalla $^{18}\text{F}\text{F}^-$ suuremmalla määrällä NaCl-liuosta (0,9 m-%) patruunasta ja tästä edelleen konsentroidimalla 150 μl tilavuus 10-20 μl :n tilavuutta vastaavaksi pisaraksi haihduttamalla lämmittäen ja argonkaasuvirran yhdistelmällä. Haihdutus tehtiin 100 °C lämpötilassa 10-30 ml/min suuruusella kaasuvirralla noin puolen tunnin ajan. Jäljelle jäänyt pisara vastasi tilavuudeltaan 20 μl , joten pienempään tilavuuteen konsentroidintia oli pitänyt jatkaa noin 40-50 minuuttia. Eluointia suoritettiin myös vettä helpommin haihtuvalla liuottimella, metanolilla, johon oli liuotettu natriumkloridia 0,9

m-% vastaava määrä. Eluointi toimi yhtä hyvin kuin pelkällä saliinilla, mutta metanoli oli haihdutettava täysin ja tästä edelleen astiaan jäänyt fluoridi liuotettiin uudelleen 20 µl saliiniliuokseen. Koska uudelleen liuottamiseen käytetyn liuoksen tilavuus oli pieni, kaiken [^{18}F]fluoridin liuottaminen oli tehtävä manuaalisesti täyspipetillä. Astiaan jäi väistämättä aktiivisuutta ja lisäksi toimenpide olisi altistanut suurelle sormialtistukselle. Metanolin käyttö ei myöskään auttanut tässä vaiheessa ajallisesti verrattuna pelkän salinen käyttöön.

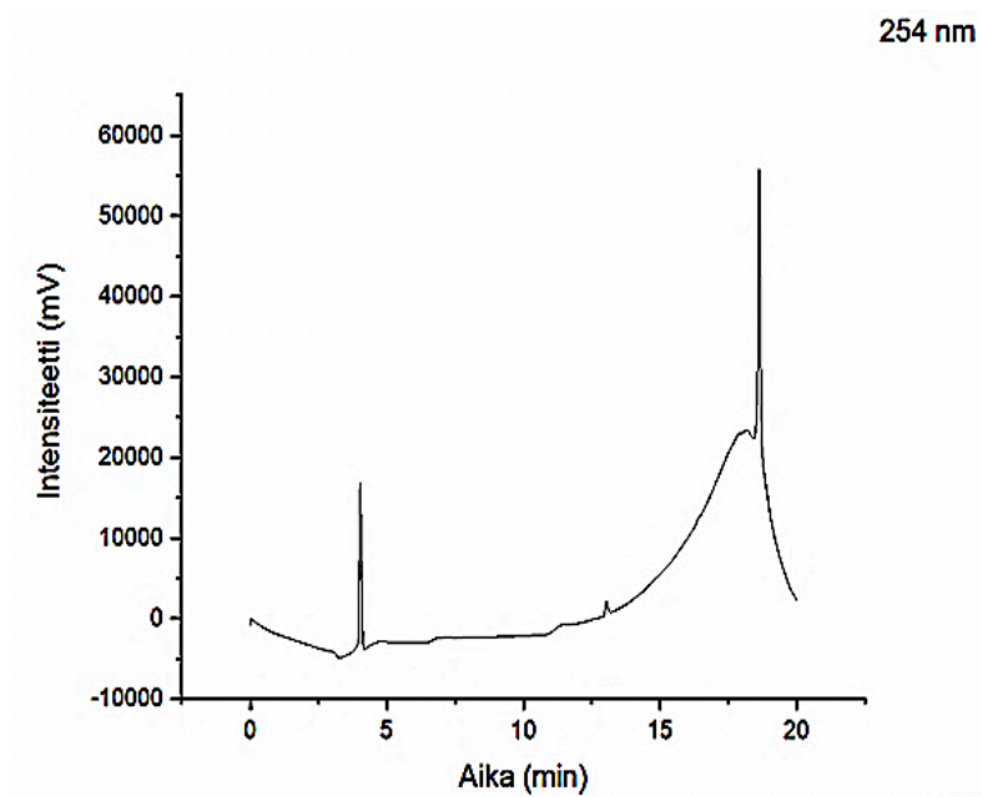
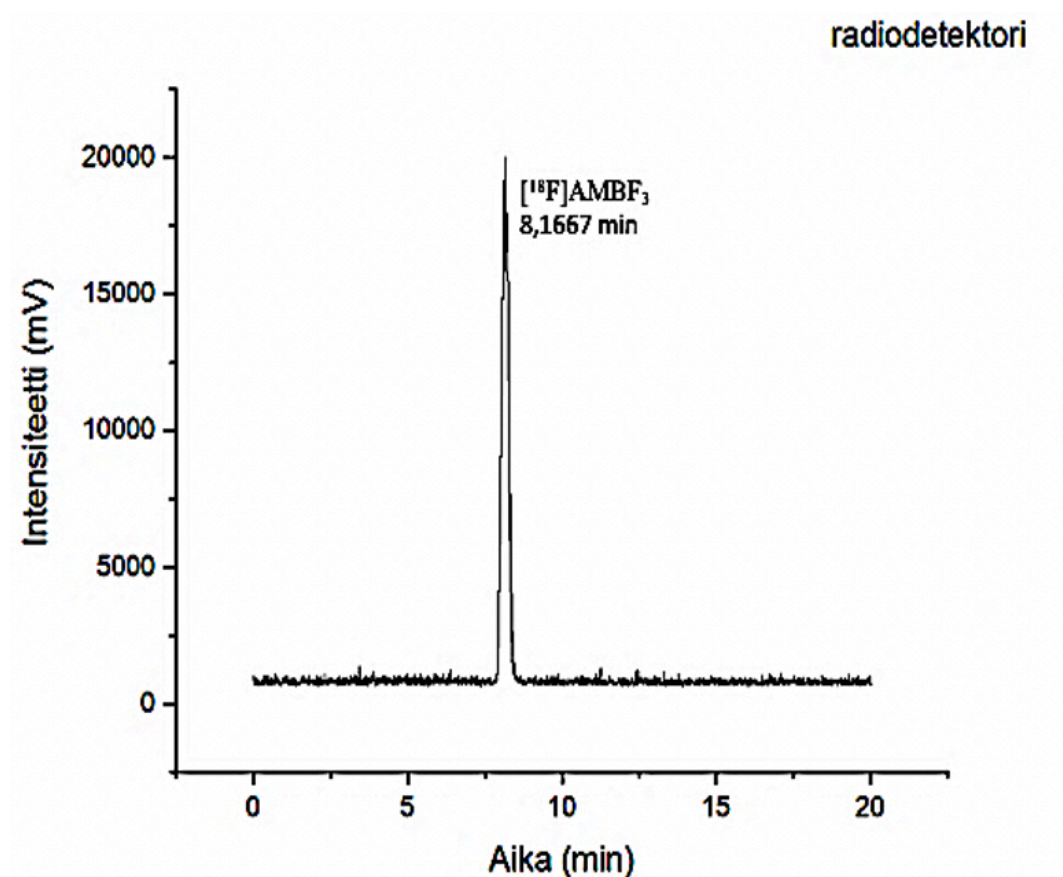
Molaarinen aktiivisuus (MA) aikarajan puitteissa arvioitiin standardisuoran sijasta lisätyn prekursorin molaarisen määrän ja puhdistetun radioleimatun merkkiaineen aktiivisuuden perusteella. MA oli tällöin suoraan verrannollinen tuotetun lähtöaktiivisuuden määrään. Esimerkiksi erien IH190724-5 ja IH190726-3 molaariset aktiivisuudet olivat 1,12 GBq/µmol ja 1,22 GBq/µmol (lähtöaktiivisuudet 1,3 ja 1,6 GBq). Standardisuoramenetelmällä saataisiin luotettavampi tieto puhdistetun radioleimatun merkkiaineen ainemäärästä. Toisaalta pelkän [^{18}F]1 tapauksessa standardisuoran ajaminen ei onnistunut puutteellisen UV-signaalin takia. Luotettavan molaarisen aktiivisuuden määrittäminen edellyttäisi siis AMBF₃:n klik-reaktiota toiseen yhdisteeseen, joka tuottaa UV-signaalin HPLC:ssä. Perrinin tutkimusryhmä teki tämän esimerkiksi AMBF₃-TATE:lle ja AMBF₃-PEG₄-NH-mTz:lle.

Viimeisimmissä kahdessa optimoidussa radiosynteeiseissä (IH190724 ja IH190726) radioleimattiin [^{18}F]1 osiossa 3.3.2 kuvatuilla synteesikaaviolla ja olosuhteilla (Kuva 34). [^{18}F]Fluoridi eluointiin 150 µl:lla salinea ja haihdutettiin 20 µl:n pisaraksi lämmittämällä ja johtamalla argonkaasuvirtaus astiaan. Konsentroidun päätteen reaktioastiaan lisättiin 317 nmol [^{18}F]1 (liuotettuna DNA-laatuiseen asetonitriliin) ja 10 µl Pyridatsiini-HCl-puskuriliuosta. Radioleimauksen päätteen radioleimattu tuote puhdistettiin Alumina N patruunalla. Laadunvarmistukseen käytettiin radio-TLC:tä. Kahden toiston perusteella voidaan todeta, että automatisoitu synteesi on toistettava, sillä molemmissa radioleimauksissa reaktioseoksen radiokemialliset saannot olivat saman suuruisia: 54,8 % ja 59,3 % (Kuva 34). Tuotteen radiokemiallinen puhtaus oli molemmissa synteeiseissä 99,9 %. Puhdistuksen jälkeen lasketut radiokemialliset saannot olivat näissä synteeiseissä 37,97 % ja 49,03 %. Ennen radiosynteesin automatisointia puhdistuksen jälkeiset RCY olivat 37-60 % suuruisia, kun taas radio-TLC määriteltyjen reaktioseoksien RCY:t olivat parhaimmillaan 86-92 %.



Kuva 34. Automatisoidun radioleimauksen radio-TLC tulokset reaktioseoksesta ja puhdistetusta lopputuotteesta $[^{18}\text{F}]1$.

$[^{18}\text{F}]1$:n referenssinäytteelle määritettiin HPLC-menetelmää useaan otteeseen ilman näkyvää UV-signaalia. Radioleimatulle tuotteella löydettiin signaali noin 8 minuutin kohdalla sekä Alltiman että Kinetexin käänteisfaasikolonneilla. $[^{18}\text{F}]2$:n laadunvarmistuksessa käytetty HPLC-menetelmällä $[^{18}\text{F}]1$:n radiosignaali havaittiin 8,1667 minuutin kohdalla. Vastaavan retentioajan kohdalla ei havaittu sitä vastaavaa UV-signaalia, mikä on nähtävissä kuvassa 35. Kuten materiaalit ja menetelmät osiossa mainittiin, UV-piikkiä ei saatu näkymään myöskään radioleimatun ja ei-radioleimatun merkkiaineen kerainjisoinnilla.



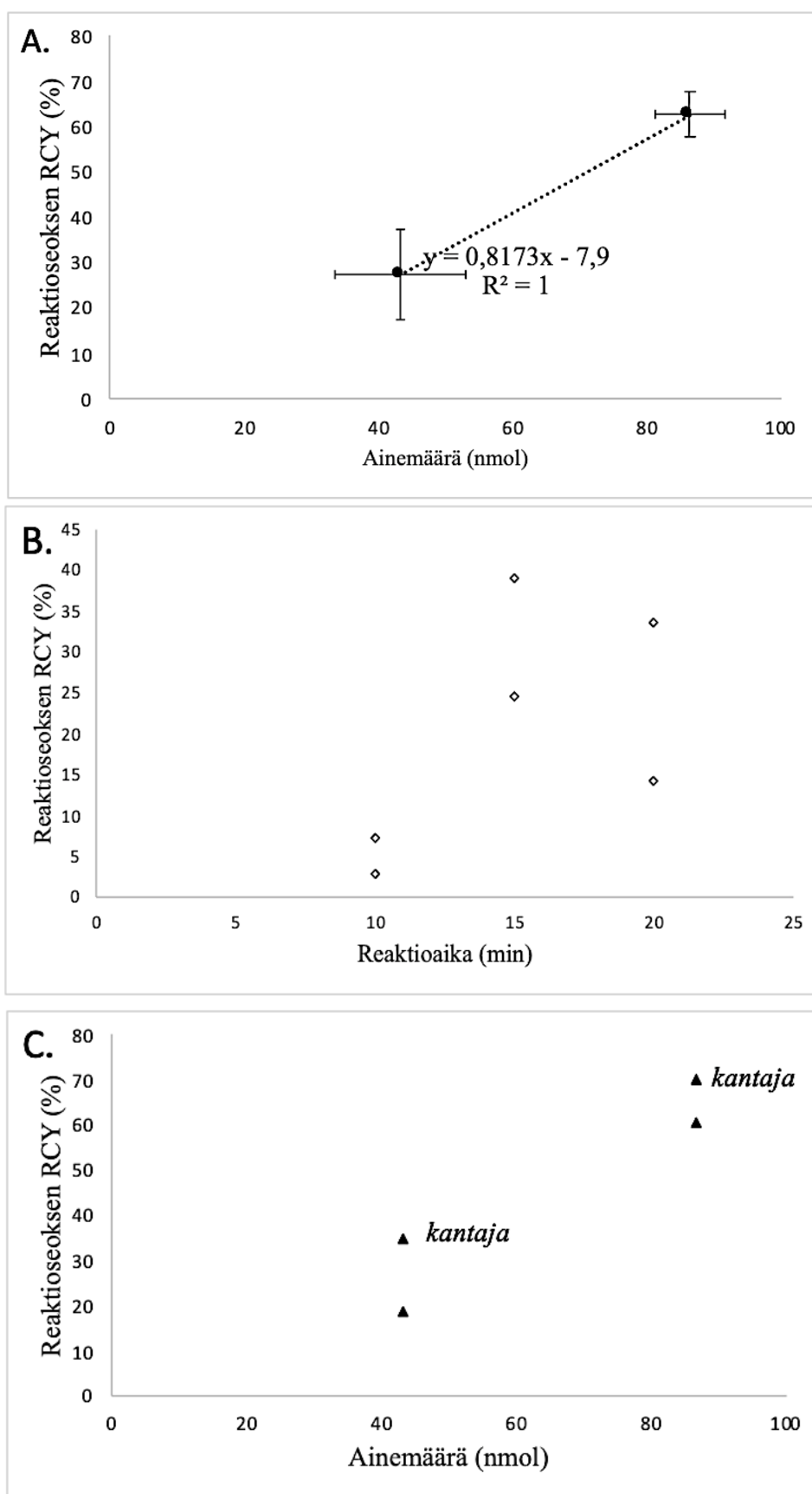
Kuva 35. $[^{18}\text{F}]\text{1}$ radio-HPLC ajossa radiosignaalia (ylempi spektri) vastaavaa UV-signaalia ei näkynyt aallonpituuksilla 209, 254 (alempi spektri) ja 330 nm.

Vaikka synteesikaaviolla saadaan toistetusti radioleimattua [^{18}F]1 hyvillä saannoilla, synteesi vaatii pientä muokkausta radioleimauksen helpottamiseksi. Synteesikaaviossa reaktioseoksen komponentit lisätään täyspipetillä R2-astiaan ja linjoihin kiinnitettyjä neuloja on siirrettävä radioleimauksen eri vaiheissa joko kiinni tai irti astioista, jolloin sormialtistuksen määrä kasvaa. Lisäksi [^{18}F]fluoridin eluointitehokkuus patruunasta on ollut vain 70 % luokkaa, jolloin kaikkea lähtöaktiivisuutta ei saa hyödynnettyä. Haihdutusvaihe on myös aikaa vievä vaihe, mikä ei ole lyhytikäisen radionuklidin kannalta suositeltavaa. Synteesikaaviota voidaan kuitenkin parantaa pienin muutoksin: esimerkiksi reaktioseosten komponentit voidaan lisätä R2-astiaan Hamilton ruiskuun liitetyllä ulkoisella teflonlinjalla. Haihdutusvaiheen välttämiseksi olisi parasta, jos aktiivisuuden saisi eluoitua jo mahdollisimman pienellä volyymilla. Pienempien eluointitilavuuksien käyttö vaatii joko manuaalisesti eluoinnin niin, että patruuna on suoraan kiinni ruiskussa tai ruiskupumpun avulla. Toisaalta vaihtoehtoinen [^{18}F]fluoridin konsentroitimetodi voisi toimia, kuten toinen patruuna eri anionilla (karbonaattianioni ja QMA- tai PS- HCO_3 -patruuna). Eluointitehokkuuden seurannassa olisi käytännön työn kannalta hyvä, jos patruuna asennettaisiin annoskalibraattoriin.

4.3 [^{18}F]2:n radiosynteesi

[^{18}F]AMBF₃-PEG₄-mTz ([^{18}F]2) radioleimauksen osalta keskityttiin manuaaliseen radioleimaukseen oikeiden reaktio-olosuhteiden määrittämiseksi. Prekursorille [^{18}F]2 löydettiin sopivien reaktio-olosuhteiden lisäksi kaksi SepPak-patruunoihin perustuvaa puhdistusmenetelmää sekä karakterisointimenetelmät radiokemiallisen puhtauden määrittämiseen.

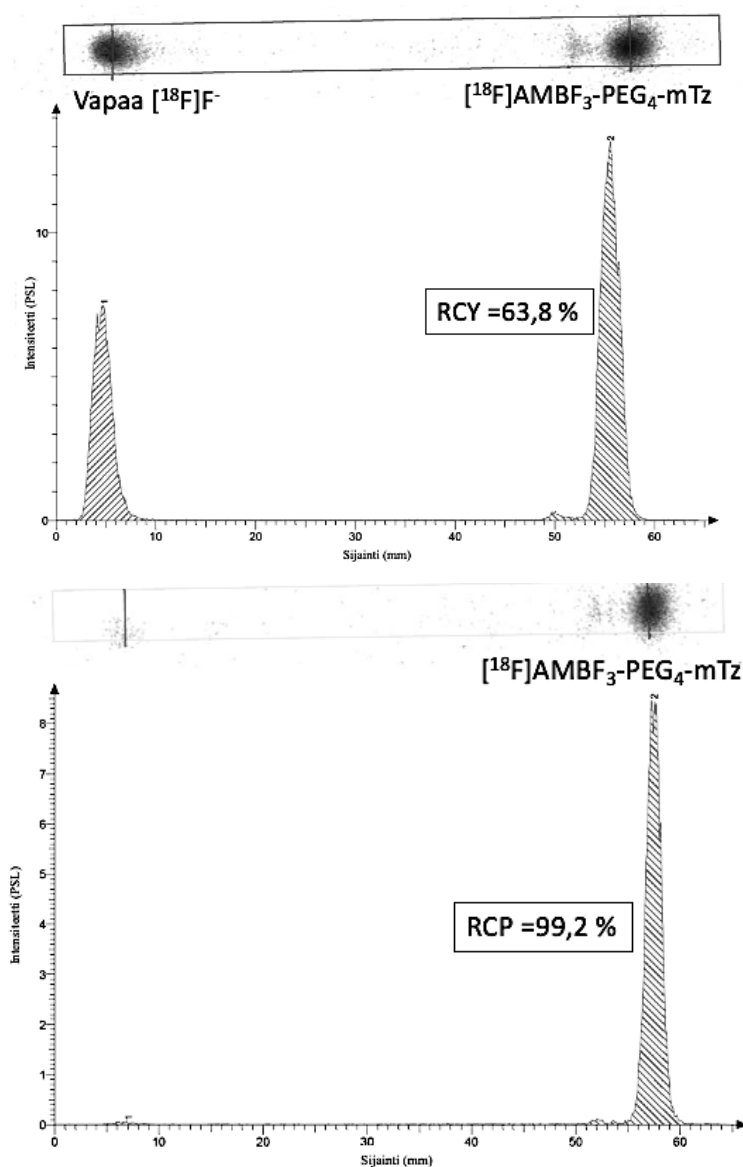
Prekursorin [^{18}F]2 ainemäärää testattiin vain kahdella eri määrällä 43 nmol ja 86 nmol. Näilläkin määrillä pystyttiin näkemään samat vaikutukset kuin [^{18}F]1:n tapauksessa: suuremmalla ainemäärällä päästään parempiin radiokemiallisiin saantoihin (Kuva 36, A). Tutkimusosuuden aikarajan puitteissa koesarjat rajoittuivat vain kahteen ainemäärän vertailuun. Tulosten luotettavuuden kannalta olisi ollut hyvä testata radioleimausta vielä 200 nmol määrällä, jotta radioleimaussaantoja olisi voinut paremmin verrata pienemmän prekursorin radioleimaukseen. Reaktioseosten kokonaistilavuudet olivat suurempia kuin 28 μl [^{18}F]1:n leimauksissa, koska [^{18}F]2 konsentraatio oli laimeampi. Konsentroidummalla merkkiaineliuoksella ja pienemmällä reaktiotilavuudella saannot olisivat olleet mahdollisesti korkeampia.



Kuva 36. [^{18}F]2 radioleimaukseen vaikuttavat tekijät. (A) [^{18}F]2 prekursorin ainemäärä reaktioseoksen RCY:n funktiona, (B) reaktioajan vaikutus RCY:n ja (C) kantajan (KHF_2 , 8 nmol) lisäyksen vaikutus saantoon.

Reaktioaikaa seurattiin kuudella koesarjalla. Kuuteen putkeen lisättiin samat määrät $[^{18}\text{F}]2$ prekursoria, puskuria ja $[^{18}\text{F}]$ fluoridia. Aikapisteiksi valittiin 10, 15 ja 20 minuuttia (2 otosta kuhunkin aikapisteeseen) $85\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa (Kuva 36, B). Reaktioajoista 15 minuuttia antoi parhaimmat radiokemialliset saannot, kun taas 10 minuutin jälkeen RCY:t olivat 10 % suuruisia. Pidemmällä reaktioajalla saannot lähtivät laskuun.

Kuten $[^{18}\text{F}]1$:n tapauksessa, myös $[^{18}\text{F}]2$:n radiosynteesissä kantajaa ei lisätty myöhemmissä kokeissa (Kuva 36, C). Kantajan lisääminen nosti saantoa vain 10 % ja parhaimmillaan ilman kantajaa päästiin samoihin lukemiin kuin kantajan kanssa. Lisäksi alhaisen molaarisen aktiivisuuden kannalta ei ollut kannattavaa lisätä kantajafluoria. Jos lisätyn prekursorin ainemäärä on pieni, silloin kantajan lisäys on varteen otettava radioleimaussaannon kannalta.



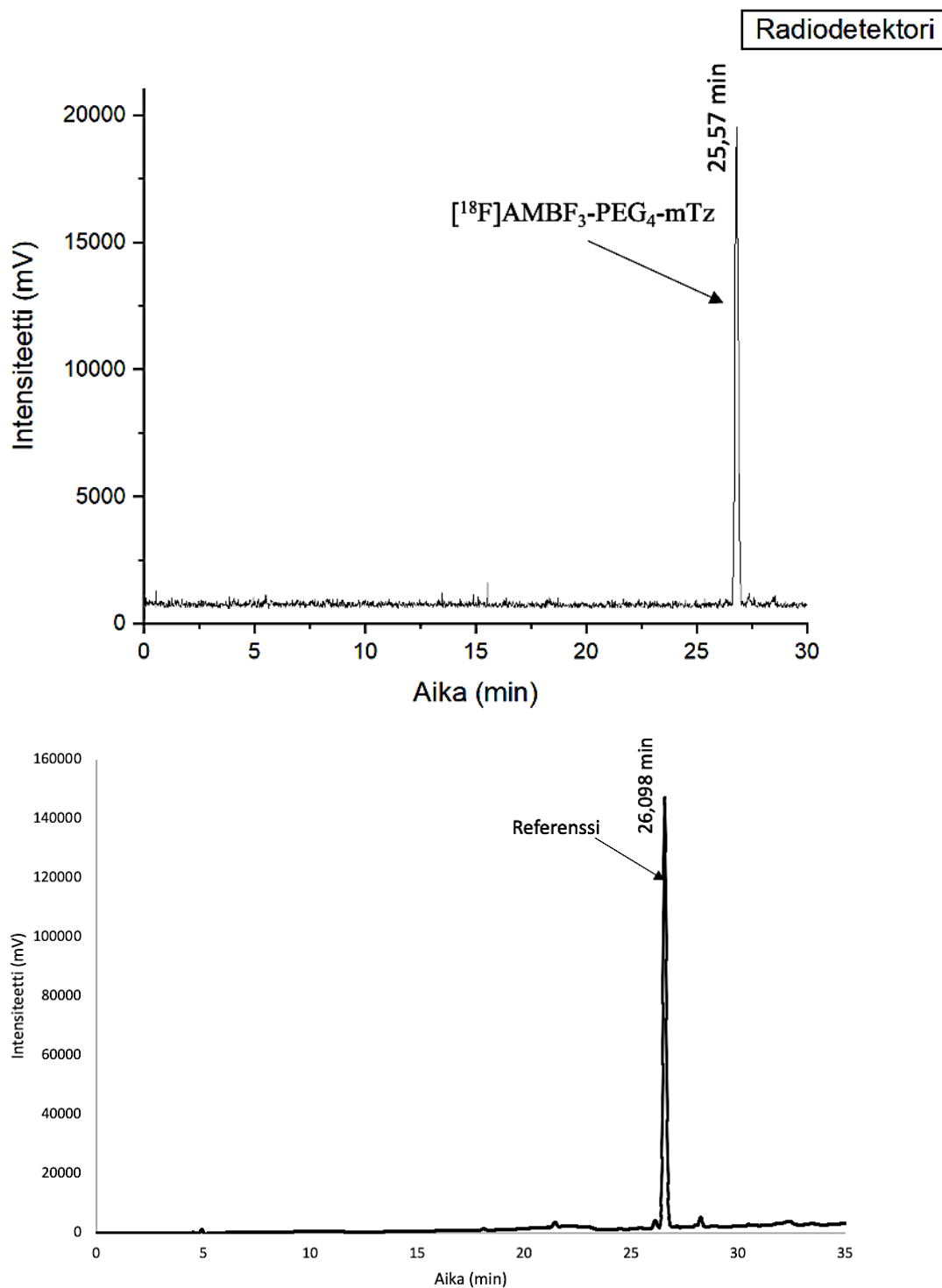
Kuva 37. $[^{18}\text{F}]2$ radiokemiallinen saanto ja puhtaus (RCY ja RCP) radio-TLC:ssä (erä IH190726-2).

Radioleimatun [^{18}F]2:n puhdistusta optimoitiin suurimmaksi osaksi Silica SepPak-patruunalla, mutta myös C18 toimi tähän tarkoitukseen yhtä hyvin. Patruunoiden kanssa ainoa ero on erotusmekanismi ja siihen liittyvä eluenttien käyttö. Käänteisfaasissa ennen polaarisen liuottimen lisäystä, vapaa [^{18}F]fluoridi huuhdellaan pois noin 5-10 ml vettä. Vasta tämän jälkeen eluoidaan pienellä määrällä (esimerkiksi asetonitriili) poolitonta liuotinta radioleimattu merkkiaine. Normaalifaasipatruunoissa vapaa [^{18}F]fluoridi jää kiinni patruunaan ja merkkiaine eluoidaan suoraan ulos patruunasta sopivalla eluentilla. Taulukossa 8 on esitetty radioleimauksen ja puhdistuksen tuloksia. Parhaimmat radioleimausolosuhteen mahdollistivat noin 60 % RCY:n radio-TLC:n perusteella reaktioseoksesta (Kuva 37). Käytetyillä menetelmillä onnistuttiin saamaan yli 95 % radiokemiallisen puhtausluokan merkkiainetta. Puhdistettujen lopputuotteiden lopullinen radioaktiivisuus verrattuna lähtöaktiivisuuksiin oli toistuvasti noin 30 % luokkaa.

Taulukko 8. [^{18}F]2:n radiokemiallisen saantojen vertailua eri puhdistusmetodeille.

Erä	n (nmol)	Reaktioseoksen RCY (%)	RCP (%)	Eristetty RCY (%)	Puhdistukseen käytetty patruuna
IH190724-3	86,5	59,1	95,6	26,05	C18
IH190724-4	86,5	66,9	99,9	23,86	silica
IH190726-1	86,5	56,3	97,8	30,1	silica
IH190726-2	86,5	63,8	99,2	38,85	silica

Merkkiaineen karakterisointiin löydettiin sopivat karakterisointimenetelmät sekä radio-TLC (Kuva 37) että -HPLC:llä (Kuva 38). Suuremman molekyylikokonsa takia aromaattiset funktionaalisuuden tuottivat voimakkaan UV-signaalin, jolloin radiosignaalin retentioaika pystyttiin todentamaan referenssiajon perusteella. [^{18}F]2:n retentio näkyy spektrissä sekä radio- että UV-signaalin osalta 26,5937 minuutin kohdalla. Radio-TLC:ssä retentiotekijä oli 0,86.



Kuva 38. Merkkiaineen $[^{18}\text{F}]\text{2}$ HPLC-radio-spektri (ylempi kuva) ja kylmäreferenssin retentio (254 nm) HPLC-UV-spektrissä (alempi kuva).

$[^{18}\text{F}]\text{2}$ merkkiaineen osalta automatisoidun radiosynteesin optimointi jäi kesken. Automatisoitua synteesikaaviota kokeiltiin kerran $[^{18}\text{F}]\text{2}$:lle alhaisella 4,4 % reaktioseoksen RCY:llä. Tämän tutkielman merkkiaineet ovat kooltaan ja rakenteeltaan erilaisia, joten niiden käyttäytyminen

radioleimauksessa ei ole täysin verrattavissa toisiinsa, vaikka olennaisin yhtäläisyys niiden välillä onkin trifluoriboraattifunktionaalisuus. [^{18}F]2:n rakenteessa on PEG₄-ketju ja tetratsiinirengas, joista erityisesti jälkimmäinen on herkkä ääriolosuhteille, kuten äkilliset pH- ja lämpötilamuutokset. Alhaiseen RCY:hyn vaikuttaa mahdollisesti korkea lämpötilan nousu 100 °C:een haihdutusvaiheessa samanaikaisesti suurehkon reaktioseoksen kokonaistilavuuden rinnalla. Lisäksi synteesissä käytetyt alhaiset ainemäärät laskevat saantoa.

4.4 Jakautumiskertoimien määrittäminen

LogD_{7.4}-arvot määritettiin molemmille prekursoreille Airaksisen tutkimusryhmän julkaisun¹³⁶ *shake flask*-menetelmällä yhdistettynä gammailmaisoinmittaukseen. Menetelmän avulla paikannettiin merkkiaineen jakautuminen kahden eri faasin välillä. Merkkiaineet leimattiin ja puhdistettiin aiemmin mainituilla menetelmillä. Radiokemialliset puhtaudet täyttivät vaaditun 95 % rajan radiokemiallisessa puhtausluokassa. Molempia merkkiaineita lisättiin kuhunkin sentrifuugiputkeen noin 100-200 kBq 20 µl:ssa etanoli:saliini (50:50) liuoksessa. Taulukoissa 9 ja 10 on esitetty jakautumiskertoimen mittaustulokset gammailmaisoinmittauksen jälkeen.

Taulukko 9. [^{18}F]1:n jakautumiskertoimen (LogD_{7.4}) määrittämiseen liittyvät mittaustulokset. Mittausaika oli 60 s.

Näyte	Pulssit (CPM)	Taustakorjatut pulssit (CPM)	m (g)	Pulssit/mssa (CPM/g)
1 (orgaaninen faasi)	2755,227349	2720,65954	0,392	6940,458017
2 (puskurifaasi)	113943,0353	111805,436	0,5263	212436,7023
3 (orgaaninen faasi)	2933,51755	2860,36995	0,3889	7355,026863
4 (puskurifaasi)	139493,2066	135158,994	0,5218	259024,5199
5 (orgaaninen faasi)	5339,660491	5141,19312	0,4068	12638,13452
6 (puskurifaasi)	131430,3827	125748,967	0,5267	238748,7501
7(orgaaninen faasi)	4999,259085	4753,05321	0,3872	12275,44733
8 (puskurifaasi)	132802,9106	125468,008	0,5353	234388,2088
9 (tausta)	19			
10 (tausta)	21			
11 (tausta)	23			
Taustan keskiarvo	21			

Taulukko 10. [¹⁸F]2:n jakautumiskertoimen (LogD_{7.4}) määrittämiseen liittyvät mittaustulokset. Mittausaika oli 60 s.

Näyte	Pulssit (CPM)	Taustakorjatut pulssit (CPM)	m (g)	Pulssit/mssa (CPM/g)
1 (orgaaninen faasi)	10579,66634	10446,93107	0,395	26447,92676
2 (puskurifaasi)	63958,34398	62758,46997	0,5189	120945,211
3 (orgaaninen faasi)	13934,72519	13587,26119	0,3836	35420,38892
4 (puskurifaasi)	66291,03558	64231,29794	0,5131	125182,8064
5 (orgaaninen faasi)	22825,70869	21977,31049	0,4017	54710,75552
6 (puskurifaasi)	58239,95788	55722,38602	0,5218	106788,7812
7(orgaaninen faasi)	23753,69266	22583,85956	0,3995	56530,31178
8 (puskurifaasi)	61289,01025	57903,92699	0,5346	108312,6206
9 (tausta)	19			
10 (tausta)	21			
11 (tausta)	23			
Taustan keskiarvo	21			

Esimerkkilaskut on esitetty [¹⁸F]1:n mittaustuloksilla. Kokonaispulssimäärästä massayksikköä kohti laskettiin keskiarvo yhtälöllä 8. Esimerkkinä [¹⁸F]1 oktanolifaasin aktiivisuuksien keskiarvo:

$$A_{c,ka}(\text{oktanoli}) = \frac{(6940,458017 + 7355,026863 + 12638,13452 + 12275,44733)}{4}$$

$$= 9696,283116 \text{ CPM/g} \sim 9696 \text{ CPM/g}$$

Keskihajonta laskettiin kaavalla 9:

$$s(\text{oktanoli}) = \sqrt{\frac{(6940,46 - 9696,28)^2 + (7355,03 - 9696,28)^2 + (12638,13 - 9696,28)^2 + (12275,45 - 9696,28)^2}{4 - 1}}$$

$$= 5055,233755 \text{ CPM/g} \sim 5055 \text{ CPM/g}$$

Jakautumiskerroin laskettiin yhtälön 10 avulla:

$$D(\text{AMBF}_3) = \frac{\left(\frac{\text{CPM}}{g}\right)_{1-\text{oktanoli}}}{\left(\frac{\text{CPM}}{g}\right)_{\text{puskuri}}} = \frac{9696,2831}{105603,10} = 0,051937381 \sim 0,04$$

Jakautumiskertoimesta otettiin kymmenkantainen logaritmi (logD) ja tulokseksi vastaaville arvoille saatiin -1,28. Keskivirhe jakautumiskertoimelle laskettiin yhtälöllä 11:

$$\Delta D_{7.4} = \sqrt{\left(\frac{\partial D_{7.4}}{\partial R_{puskuri}} * \Delta R_{1-oktanoli}\right)^2 + \left(\frac{\partial D_{7.4}}{\partial R_{1-oktanoli}} * \Delta R_{puskuri}\right)^2}$$

$$= \sqrt{\left(\frac{5055,23 \text{ CPM/g}}{186691,80 \text{ CPM/g}}\right)^2 + \left(-\frac{9696,28 \frac{\text{CPM}}{\text{g}} * 105603,08 \text{ CPM/g}}{(186691,80)^2}\right)^2} = 0,039953$$

LogD:n keskivirhe laskettiin yhtälön 12 avulla

$$\Delta \log D_{7.4} = \sqrt{\left(\frac{\partial \log D_{7.4}}{\partial D_{7.4}} * \Delta D_{7.4}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{\log(e)}{0,051937381} * 0,039953\right)^2} = 0,33,$$

missä $\Delta \log D_{7.4}$ on logaritmisen jakaantumiskertoimen keskivirhe.

Taulukoissa 11 ja 12 on esitetty merkkiaineiden lipofiilisyyismäärittelyn laskennalliset tulokset keskivirheineen.

Taulukko 11. [¹⁸F]1 lipofiilisyyismäärittelyn laskennalliset tulokset.

[¹⁸F]1 arvot	Tulos
$A_{ka}(1 - oktanoli)$	$9696 \pm 5055 \text{ CPM/g}$
$A_{ka}(puskuri)$	$186692 \pm 105603 \text{ CPM/g}$
$\log D_{7.4}$	$-1,28 \pm 0,33$

Taulukko 12. [¹⁸F]2 lipofiilisyyismäärittelyn laskennalliset tulokset.

[¹⁸F]2 arvot	Tulos
$A_{ka}(1 - oktanoli)$	$42802 \pm 14394 \text{ CPM/g}$
$A_{ka}(puskuri)$	$113986 \pm 51636 \text{ CPM/g}$
$\log D_{7.4}$	$-0,43 \pm 0,25$

5 Johtopäätökset

Tutkielman kokeellisen työn tarkoituksena oli optimoida automatisoitu radiosynteesi ammoniummetyyli[^{18}F]fluoriboraatille eli [^{18}F]1:lle konsentroiden [^{18}F]fluoridi kaupallisesta μQMA -patruunasta 0,9 % natriumkloridiliuoksella. Lisäksi tutkimustyössä optimoitiin radioleimausolosuhteet [^{18}F]2:lle. Radiosynteesin optimointi edellytti kylmäreferenssien ja itse prekursorien syntetisointia sekä niiden karakterisointia kromatografisin ja ydinmagneettiresonanssin menetelmin.

Prosteettisten ryhmien orgaaniset synteesit olivat nopeita, mutta lopputuotteen puhdistus oli kahtaisioniluonteen takia haastavaa. AMBF_3 :n kaksivaiheisessa synteesissä välituotetta, AMBPin ei puhdistettu ennen viimeistä reaktiovaihetta. Orgaanisen synteesin kokeellinen saanto oli 72 % eli 26,7 mg. Karakterisointi suoritettiin ESI-TOF-MS:n ja usean NMR-spektrin avulla (^{11}B , ^{19}F , ^{13}C ja ^1H), joiden nojalla saatiin varmuus lopputuotteen rakenteen vastaavuudesta Perrinin tutkimusryhmän tuloksiin^{76,82}. AMBF_3 :n kemiallisen puhtauden kvantitatiivista määrittystä ei tehty, sillä kolmoissidos ei tuottanut riittävää UV-signaalia HPLC- ja LC-MS-karakterisoinneissa. NMR-spektreissä ei tosin havaittu puhdistetun AMBF_3 :n tapauksessa liuotinsignaalien lisäksi tunnistamattomia epäpuhtauspiikkejä. Massaspektrometriassa AMBF_3 :lle havaittiin $[\text{M}-\text{F}]^+$ ja $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ adduktien laskennallisia arvoja vastaavat kokeelliset mittaustulokset. Näiden karakterisointien perusteella ei voida kuitenkaan osoittaa prosentuaalista puhtautta kvantitatiivisesti vaan ainoastaan voidaan todeta tuotteen olevan suhteellisen puhdasta.

Nestekromatografista analyysiä varten prosteettinen ryhmä voidaan liittää kromoforiseen molekyyliin atsidi-alkyyni sykloadditiolla. Tällöin molekyylin karakterisointi on luotettavampaa kromatografisin menetelmin. Tutkielmatyön toisen prosteettisen ryhmän, $\text{AMBF}_3\text{-PEG}_4\text{-mTz}$, orgaaninen synteesi oli yksivaiheinen ja nopea. Lopputuotteen puhdistus onnistui C18-patruunan avulla (SepPak) ja reaktion etenemistä seurattiin sekä TLC- että HPLC-menetelmillä. Prosentuaalisen puhtauden määrittäminen onnistui myös nestekromatografisin menetelmin (97 %). Yhdisteen NMR-karakterisointiin toimivat samat määitykset kuin AMBF_3 :lle, mutta ^{11}B ja ^{13}C NMR-spektrien analysointi jäivät tässä tutkielmatyössä määrittämättä vähäisen lopputuotteen määrän takia. Alle 5-10 mg:n saannoilla ^1H - ja ^{19}F -NMR ovat herkempiä, minkä takia ne ajettiin ensimmäisenä. Prosteettisen ryhmän karakterisoinnin kannalta olisi ollut kannattavaa syntetisoida suurempi määrä $\text{AMBF}_3\text{-PEG}_4\text{-mTz}$:a ja analysoida sekä ^{11}B - että ^{13}C -NMR:t. Massaspektrometrisessä

karakterisoinnissa havaittiin $[M-F]^+$ ja $[M+Na]^+$ adduktien laskennallisia arvoja vastaavat kokeelliset tulokset.

$[^{18}F]$ Fluoriboraattien radioleimaus perustuu ^{19}F - ^{18}F isotooppiseen vaihtoreaktioon. Reaktiossa käytettiin lämpötilana 85 °C ja radioleimattu prekursori muodostui 10-15 minuutin reaktion aikana. Radioleimatut lopputuotteet puhdistettiin Alumina N ja Silica patruunoiden avulla eikä aikaa vievää HPLC-puhdistusta tarvittu. Atseotrooppinen tislaukset pystyttiin ohittamaan, sillä radioleimausreaktio tapahtuu vesiliuoksessa. Reaktioiden saannot olivat riippuvaisia prekursorin molaarisesta määrästä ja reaktioseoksen kokonaistilavuudesta. Parhaimmat radiokemialliset saannot saatiin alle 17-28 μ l:n reaktiotilavuuksilla ja suurilla prekursorin ainemäärillä (AMBF₃ 300 nmol ja AMBF₃-PEG₄-mTz 86 nmol).

$[^{18}F]$ Fluoridin konsentroidin isotooppiseen vaihtoreaktioon on haastava vaihe radiosynteesin optimoinnissa, sillä eluointi on tehtävä hitaasti ja patruunaan pidähtynyt aktiivisuus oli eluoitava pienessä tilavuudessa. Lopulta konsentroidin päädyttiin eluoimaan 150 μ l:lla 0,9 % NaCl-liuoksella, minkä jälkeen $[^{18}F]$ fluoridi saliniliuokseen liuenneena haihdutettiin argonkaasuvirran avulla 20 μ l:n tilavuuteen 100 °C:ssa 45 minuutin ajan. Hidas haihdutusvaihe pitkittää radiosynteesiä kokonaisuudessa melkein yhden fluori-18 puoliintumisajan pituiseksi. Perrinin tutkimusryhmä eluoi $[^{18}F]$ fluoridin patruunasta 70 μ l:lla 0,9 % NaCl-liuosta, jolloin he saivat radioleimattua $[^{18}F]$ AMBF₃-TATE:n 25-30 % RCY:llä.⁸² Näihin tuloksiin päästiin myös tässä kokeellisessa työssä ilman haihdutusta, mutta kyseisellä tilavuudella eluointitehokkuus patruunasta oli alhainen. Haihdutusvaihe kuitenkin paransi puoliintumisaikakorjattua radiokemiallista saantoa 40-60 %:iin ja suuremmalla tilavuudella eluointi nosti eluointitehokkuuden patruunasta lähemmäs 95 %:a.

Radiokemiallisten saantojen perusteella $[^{18}F]$ 1 kestää hyvin haihdutukseen liittyvät suuret lämpötilamuutokset tässä työssä automatisoidussa radiosynteesissä. Lisäksi $[^{18}F]$ AMBF₃ automatisoidun radiosynteesin saannot olivat toistettavia. $[^{18}F]$ AMBF₃-PEG₄-mTz radioleimattiin vain kerran automatisoidulla radiosynteesillä 4 %:n reaktioseoksen RCY:llä. Jotta $[^{18}F]$ AMBF₃-PEG₄-mTz saataisiin leimattua $[^{18}F]$ 1:ää vastaavilla RCY:llä, toisen konsentroidintimenetelmän optimointi radiosynteesiin ilman äkillisiä lämpötilamuutoksia voisi parantaa herkempien molekyylien radioleimauksen saantoa. Manuaalisessa radioleimaustesteissä $[^{18}F]$ 2:n RCY:t olivat toistettavasti 23-38 %. $[^{18}F]$ 2:n radiosynteesi tarvitsee tulevaisuudessa lisäoptimointia, mutta vaihtoehtoisia konsentroidintimeteja synteesiajan lyhentämiseksi on olemassa. Konsentroidintimenetelmään voisi käyttää toista

anioninvaihtopatruunaa esimerkiksi toisen anionin kanssa: esimerkiksi normaali QMA ja PS-HCO₃ patruunat karbonaattianionin kanssa. Ruiskupumpun lisäys patruunan yhteyteen synteesikaaviossa (Kuva 26) lisääisi eluointitehokkuutta ja -toistettavuutta. Eluointitehokkuudessa voi olla paljon vaihtelua työntekijän eluointitekniikasta riippuen. Työskentelyn harjaantuessa eluointinopeus kuitenkin tasoittuu johtaen toistettaviin radioleimaussaantoihin.

Suurilla lähtöaineen ainemäärillä radioleimatun merkkiaineen molaarinen aktiivisuus laskee. Näissä radiosynteesikokeiluissa havaittiin kuitenkin MA:n olevan suoraan verrannollinen radiosynteesissä tuotettuun lähtöaktiivisuuteen. Perrinin ryhmä on julkaissut [¹⁸F]AMBF₃-TATE:n molaariseksi aktiivisuudeksi 40–111 GBq/μmol⁸². Radiosynteesien jatkotutkimusten kannalta on kannattavaa tehdä radiosyntesejä suuremmilla lähtöaktiivisuuksilla kuin tässä työssä tuotetuilla lähtöaktiivisuuksilla (yli 2-4 GBq). Toisaalta tässä työssä molaarinen aktiivisuus arvioitiin vain käytetyn prekursorin määrän ja radioleimatun lopputuotteen aktiivisuuden perusteella standardisuoramäärityksen sijasta. Standardisuoraa varten kylmäreferenssistä valmistetaan eri pitoisia referenssinäytteitä, jotka ajetaan riittävän monta kertaa HPLC:llä (vähintään 3 kertaa kutakin liuosta). Näistä tuloksista piirretään suora, josta nähdään ainemäärän ja UV-signaalin tuottaman retentiopiikin pinta-alan suhde. Suoran avulla voidaan laskea radioleimatun merkkiaineen ainemäärä HPLC-karakterisoinnissa, kun tiedetään injisoidun merkkiaineen määrä sekä lopputuotteen massa liuotintiheysineen. Tämän tutkielman kannalta olisi ollut hyödyllistä määrittää MA tällä menetelmällä [¹⁸F]2:lle, jolloin määritetty MA on luotettavampi kuin pelkän lisätyn ainemäärän perusteella laskettu MA ja samalla vertailukelpoisempi Perrinin tutkimusryhmän tulosten rinnalla.

Laadunvarmistusmenetelmissä [¹⁸F]1:n tapauksessa voidaan nojata ainoastaan radio-TLC-menetelmään. Radiolääkeaineiden tuotannossa laadunvarmistus HPLC:llä tuo lisätietoa muista mahdollisista radioaktiivista sivutuotteista, jotka eivät TLC-levyllä välttämättä erotu toisistaan. Laadunvarmistuskokeissa [¹⁸F]1:lle havaittiin radioaktiivinen retentiopiikki, mutta kylmäreferenssin UV-signaalin puuttumisen takia laadunvarmistusmenetelmänä radio-UV-HPLC ei ole tälle merkkiaineelle luotettava. Kuten orgaanisten synteesien kohdalla mainittiin, myös radiosynteseissä [¹⁸F]1 konjugoituna joko toiseen pienmolekyyliin tai suoraan biomolekyyliin parantaa merkkiaineen karakterisoinnin luotettavuutta. Vaikka [¹⁸F]2:n käyttö prosteettisena ryhmänä ¹⁸F-leimauksissa vaikuttaa lupaavalta, radiosynteesin lisäksi on optimoitava prosteettisen ryhmän IEDDA biokonjugaatiota sopivaan peptidiin.

Prosteettisten ryhmien $\text{LogD}_{7.4}$ -arvoiksi saatiin $-1,28 \pm 0,33$ (^{18}F 1) ja $-0,43 \pm 0,25$ (^{18}F 2) niin sanotulla *shake flask*-menetelmällä. Lukemien perusteella nähdään, että molemmat merkkiaineet ovat hydrofiilisiä. ^{18}F 1 on odotetusti vesiliukoisempi kuin ^{18}F 2, koska sillä ei ole rakenteessaan PEGylaattiketjua tai aromaattisia renkaita, kuten ^{18}F 2:lla. Lipofiilisyyden määrittämisessä käytettiin alhaisia aktiivisuuksia, mikä selittää keskivirheiden suuruuden. ^{18}F 2:n tapauksessa faasien pulssilukemissa oli suurempia vaihteluita ja sen seurauksena $\text{LogD}_{7.4}$ -arvon keskivirhe on suuri, mikä todennäköisesti johtuu huolimattomasta pipetoinnista näytteen otossa. Lipofiilisyysskoheet on siis toistettava mielellään suuremmilla aktiivisuuksilla. Rasvaliukoisuusmääritykset tehtiin valmiiksi neutraalista merkkiaineliuoksesta, joten formulaatiolla ei pitäisi olla vaikutusta merkkiaineiden jakautumiseen eri faasien välillä. Merkkiaineiden liuosformulaatio (etanoli:saliini 50:50) ei kuitenkaan ole sellaisenaan sopiva i.v. (i.v. eli intravenoosi) annosteluun, sillä formulaation alkoholipitoisuus on liian suuri. Mahdollisiin biodistributio- tai toksisuustutkimuksiin saliini ja PBS-puskuriliuos (pH 7.4) ovat hyviä vaihtoehtoja merkkiaineiden liuosformulaatioiksi.

Yhteenvetona molemmat ^{18}F -leimatut trifluoriboraatit syntetisoitiin onnistuneesti ja potentiaalinen automatisoitu radiosynteesi saatiin kehitettyä. Synteesikaavion pienillä optimoinneilla ja muutoksilla liittyen ^{18}F fluoridin konsentroidiin radiosynteesi voidaan muokata entistä nopeammaksi ja turvallisemmaksi säteilyaltistuksen kannalta. Automatisoitu radiosynteesi toimi toistettavasti ^{18}F 1:lle 37,97 % ja 49,03 % eristetyillä radiokemiallisilla saannoilla. ^{18}F 2:lle löydettiin myös toistettavat radioleimausolosuhteet 23-38 % RCY:llä, mutta radiosynteesin automatisoinnin optimointia ei testattu riittävästi. Merkkiaineiden orgaanisen synteesiin liittyvät karakterisoinnit määritettiin pitkälti NMR-, MS- ja HPLC-spektrien avulla. Erityisesti trifluoriboraattifunktionalisuuden karakterisointiin löydettiin hyödylliset menetelmät ^{11}B - ja ^{19}F -NMR-mittauksesta. Trifluoriboraatit tarjoavat helpon ja nopean ^{18}F -radioleimausmenetelmän, joka on yhdistettävissä pien- ja makromolekyyleihin. Nopean reaktiokinetiikan lisäksi merkkiaineet on helppo puhdistaa 98-99,9 % radiokemialliseen puhtausluokkaan. Menetelmän merkittävin haaste on ^{18}F fluoridin konsentroidi pieneen tilavuuteen (jopa 5-10 μl), sillä reaktiosaannot laskevat merkittävästi suurissa reaktiotilavuuksissa (yli 30 μl). Automatisoitua radiosynteesiä voidaan kehittää muun muassa vaihtoehtoisilla konsentroidintimenetelmillä sekä välttämällä äkillisiä korkeita lämpötilamuutoksia reaktiolämmön ohella.

6 Viiteluettelo

- 1 S. R. Cherry, *J. Clin. Pharmacol.*, 2001, **41**, 482–491.
- 2 E. W. Price and C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 260–290.
- 3 B. J. B. Nelson, J. Wilson, S. Richter, M. J. M. Duke, M. Wuest and F. Wuest, *Nucl. Med. Biol.*, 2020, **80–81**, 24–31.
- 4 P. W. Miller, N. J. Long, R. Vilar and A. D. Gee, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2008, **47**, 8998–9033.
- 5 O. Jacobson, D. O. Kiesewetter and X. Chen, *Bioconjug. Chem.*, 2015, **26**, 1–18.
- 6 J. S. Lewis, A. D. Windhorst and B. M. Zeglis, Eds., *Radiopharmaceutical chemistry*, Springer, 2019.
- 7 M. S. Berridge, S. M. Apana and J. M. Hersh, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2009, **52**, 543–548.
- 8 A. Bondi, *J. Phys. Chem.*, 1964, **68**, 441–451.
- 9 S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow and V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 320–330.
- 10 M. Guillaume, A. Luxen, B. Nebeling, M. Argentini, J. C. Clark and V. W. Pike, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part*, 1991, **42**, 749–762.
- 11 F. Devillet, J.-M. Geets, M. Ghyoot, E. Kral, O. Michaux, B. Nactergal and V. Nuttens, *PERFORMANCE OF IBA NEW CONICAL SHAPED NIOBIUM [18 O] WATER TARGETS*, 2013.
- 12 V. Casella, T. Ido, A. P. Wolf, J. S. Fowler, R. R. MacGregor and T. J. Ruth, *J. Nucl. Med.*, 1980, **21**, 750–757.
- 13 R. J. Nickles, M. E. Daube and T. J. Ruth, *An 1802 Target for the Production of [18F]F2*, 1984, vol. 35.
- 14 H. H. Coenen, P. H. Elsinga, R. Iwata, M. R. Kilbourn, M. R. A. Pillai, M. G. R. Rajan, H. N. Wagner and J. J. Zaknun, , DOI:10.1016/j.nucmedbio.2010.04.185.
- 15 K. Hamacher, H. H. Coenen and G. Stocklin, *J. Nucl. Med.*, 1986, **27**, 235–238.
- 16 L. Cai, S. Lu and V. W. Pike, *European J. Org. Chem.*, 2008, 2853–2873.
- 17 A. M. J. Paans, A. Van Waarde, P. H. Elsinga, A. T. M. Willemsen and W. Vaalburg, *Positron emission tomography: the conceptual idea using a multidisciplinary approach*, .
- 18 W. Wadsak and M. Mitterhauser, *Eur. J. Radiol.*, 2010, **73**, 461–469.
- 19 D. Van Der Born, A. Pees, A. J. Poot, R. V. A. Orru, A. D. Windhorst and D. J. Vugts, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 4709.
- 20 Y. S. Ding, C. Y. Shiue, J. S. Fowler, A. P. Wolf and A. Plenevaux, *J. Fluor. Chem.*, 1990, **48**, 189–206.
- 21 K. Hamacher and H. H. Coenen, *Appl. Radiat. Isot.*, 2002, **57**, 853–856.
- 22 D. W. Kim, D. S. Ahn, Y. H. Oh, S. Lee, H. S. Kil, S. J. Oh, S. J. Lee, J. S. Kim, J. S. Ryu, D. H. Moon and D. Y. Chi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 16394–16397.
- 23 S. J. Lee, S. J. Oh, D. Y. Chi, D. H. Moon and J. S. Ryu, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2012, **33**, 2177–2180.
- 24 J. W. Seo, B. S. Lee, S. J. Lee, S. J. Oh and D. Y. Chi, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2011, **32**, 71–76.
- 25 L. Dolci, F. Dolle, S. Jubeau, F. Vaufrey and C. Crouzel, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 1999, **42**, 975–985.
- 26 S. Stone-Elander and N. Elander, *Appl. Radiat. Isot.*, 1993, **44**, 889–893.
- 27 H. Doi, J. Barletta, M. Suzuki, R. Noyori, Y. Watanabe and B. Långström, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 3063–3066.
- 28 N. Miyaura and A. Suzuki, *Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds*, 1995, vol. 95.
- 29 J. F. Hartwig, , DOI:10.1021/ar970282g.

- 30 C. Amatore, E. Carré, A. Jutand and Y. Medjour, , DOI:10.1021/om020439v.
- 31 O. Solin, J. Bergman, M. I. Haaparanta and A. Reissell, *Production of ^{18}F from Water Targets. Specific Radioactivity and Anionic Contaminants*, 1988, vol. 39.
- 32 E. F. J. De Vries, G. Luurtsema, M. Brüssermann, P. H. Elsinga and W. Vaalburg, *Appl. Radiat. Isot.*, 1999, **51**, 389–394.
- 33 J. Bergman and O. Solin, *Nucl. Med. Biol.*, 1997, **24**, 677–683.
- 34 A. Krzyczmonik, T. Keller, A. K. Kirjavainen, S. Forsback and O. Solin, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2017, **60**, 186–193.
- 35 H. Teare, E. G. Robins, A. Kirjavainen, S. Forsback, G. Sandford, O. Solin, S. K. Luthra and V. Gouverneur, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2010, **49**, 6821–6824.
- 36 F. Oberdorfer, E. Hofmann and W. Maier-Borst, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 1988, **25**, 999–1005.
- 37 M. Namavari, A. Bishop, N. Satyamurthy, G. Bida and J. R. Barrio, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part*, 1992, **43**, 989–996.
- 38 E. Hess, S. Sichler, A. Kluge and H. H. Coenen, *Appl. Radiat. Isot.*, 2002, **57**, 185–191.
- 39 I. Rutten, J. E. Cabay, N. Withofs, C. Lemaire, J. Aerts, V. Baart and R. Hustinx, *J. Nucl. Med.*, 2007, **48**, 720–725.
- 40 H.-M. Park, (123)I: *Almost a designer radioiodine for thyroid scanning*, SciTech Premium Collection, 2002, vol. 43.
- 41 O. Jacobson and X. Chen, *PET Designated Fluoride-18 Production and Chemistry*, 2010.
- 42 M. Lipowska, J. Klenc, D. Shetty, J. A. Nye, H. Shim and A. T. Taylor, *Nucl. Med. Biol.*, 2014, **41**, 248–253.
- 43 J. S. Fowler and T. Ido, *Semin. Nucl. Med.*, 2002, **32**, 6–12.
- 44 S. Yu, *Biomed. Imaging Interv. J.*, 2006, 2.
- 45 S. Khoshbakht, F. Kobarfard, D. Beiki, O. Sabzevari, M. Amini, F. Mehrnejad, K. Tabib and S. Shahhosseini, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2016, **307**, 1125–1134.
- 46 M. Namavari, Z. Cheng, R. Zhang, De Abhijit, J. Levi, J. K. Hoerner, S. S. Yaghoubi, F. A. Syud and S. S. Gambhir, *Bioconjug. Chem.*, 2009, **20**, 432–436.
- 47 S. Richter and F. Wuest, *Molecules*, 2014, **19**, 20536–20556.
- 48 R. Haubner, H. J. Wester, F. Burkhardt, R. Senekowitsch-Schmidtke, W. Weber, S. L. Goodman, H. Kessler and M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.*, 2001, **42**, 326–336.
- 49 R. Haubner, H. J. Wester, W. A. Weber, C. Mang, S. I. Ziegler, S. L. Goodman, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler and M. Schwaiger, *Cancer Res.*, 2001, **61**, 1781–1785.
- 50 G. Vaidyanathan and M. R. Zalutsky, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation.*, 1992, **19**, 275–281.
- 51 G. Tang, W. Zeng, M. Yu and G. Kabalka, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2008, **51**, 68–71.
- 52 D. Thonon, D. Goblet, E. Goukens, G. Kaisin, J. Paris, J. Aerts, S. Lignon, X. Franci, R. Hustinx and A. Luxen, *Mol. Imaging Biol.*, 2011, **13**, 1088–1095.
- 53 J. Marik and J. L. Sutcliffe, *Appl. Radiat. Isot.*, 2007, **65**, 199–203.
- 54 J. Marik, S. H. Hausner, L. A. Fix, M. K. J. Gagnon and J. L. Sutcliffe, *Bioconjug. Chem.*, 2006, **17**, 1017–1021.
- 55 M. Berndt, J. Pietzsch and F. Wuest, *Nucl. Med. Biol.*, 2007, **34**, 5–15.
- 56 T. Kniess, M. Kuchar and J. Pietzsch, *Appl. Radiat. Isot.*, 2011, **69**, 1226–1230.
- 57 D. O. Kiesewetter, O. Jacobson, L. Lang and X. Chen, , DOI:10.1016/j.apradiso.2010.09.023.
- 58 R. Schirmacher, G. Bradtmöller, E. Schirmacher, O. Thews, J. Tillmanns, T. Siessmeier, H. G. Buchholz, P. Bartenstein, B. Wängler, C. M. Niemeyer and K. Jurkschat, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2006, **45**, 6047–6050.
- 59 A. Höhne, L. Yu, L. Mu, M. Reiher, U. Voigtmann, U. Klar, K. Graham, P. A. Schubiger and S. M. Ametamey, *Chem. - A Eur. J.*, 2009, **15**, 3736–3743.
- 60 A. Höhne, L. Mu, M. Honer, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, K. Graham, T. Stellfeld, S.

- Borkowski, D. Berndorff, U. Klar, U. Voigtmann, J. E. Cyr, M. Friebe, L. Dinkelborg and A. Srinivasan, *Bioconjug. Chem.*, 2008, **19**, 1871–1879.
- 61 J. Zhu, J. Chin, C. Wängler, B. Wängler, R. B. Lennox and R. Schirmacher, *Bioconjug. Chem.*, 2014, **25**, 1143–1150.
- 62 C. Wängler, B. Waser, A. Alke, L. Iovkova, H.-G. Buchholz, S. Niedermoser, K. Jurkschat, C. Fottner, P. Bartenstein, R. Schirmacher, J.-C. Reubi, H.-J. Wester and B. Wängler, , DOI:10.1021/bc100316c.
- 63 S. Berke, A.-L. Kampmann, M. Wuest, J. J. Bailey, B. Glowacki, F. Wuest, K. Jurkschat, R. Weberskirch and R. Schirmacher, , DOI:10.1021/acs.bioconjchem.7b00630.
- 64 S. Niedermoser, J. Chin, C. Wngler, A. Kostikov, V. Bernard-Gauthier, N. Vogler, J. P. Soucy, A. J. McEwan, R. Schirmacher and B. Wngler, *J. Nucl. Med.*, 2015, **56**, 1100–1105.
- 65 B. Wängler, G. Quandt, L. Iovkova, E. Schirmacher, C. Wängler, G. Boening, M. Hacker, M. Schmoeckel, K. Jurkschat, P. Bartenstein and R. Schirmacher, *Bioconjug. Chem.*, 2009, **20**, 317–321.
- 66 S. Otaru, S. Imlimthan, M. Sarparanta, K. Helariutta, K. Wähälä and A. Airaksinen, *Molecules*, 2020, **25**, 1208.
- 67 J. Zhu, S. Li, C. Wängler, B. Wängler, R. B. Lennox and R. Schirmacher, *J. Name Commun. This J. is J. Name*, 2013, **00**, 1–3.
- 68 S. Lindner, C. Michler, S. Leidner, C. Rensch, C. Wä, R. Schirmacher, P. Bartenstein and B. Rn Wä, , DOI:10.1021/bc400588e.
- 69 W. J. McBride, R. M. Sharkey, H. Karacay, C. A. D’Souza, E. A. Rossi, P. Laverman, C. H. Chang, O. C. Boerman and D. M. Goldenberg, *J. Nucl. Med.*, 2009, **50**, 991–998.
- 70 E. P. Gillis, K. J. Eastman, M. D. Hill, D. J. Donnelly and N. A. Meanwell, , DOI:10.1021/acs.jmedchem.5b00258.
- 71 W. J. McBride, C. A. D’souza, R. M. Sharkey and D. M. Goldenberg, , DOI:10.1016/j.apradiso.2011.08.013.
- 72 P. Laverman, W. J. McBride, R. M. Sharkey, A. Eek, L. Joosten, W. J. G. Oyen, D. M. Goldenberg and O. C. Boerman, *J. Nucl. Med.*, 2010, **51**, 454–461.
- 73 I. Dijkgraaf, S. Y. A. Terry, W. J. McBride, D. M. Goldenberg, P. Laverman, G. M. Franssen, W. J. G. Oyen and O. C. Boerman, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2013, **8**, 238–245.
- 74 I. Dijkgraaf, G. M. Franssen, W. J. McBride, C. A. D’Souza, P. Laverman, C. J. Smith, D. M. Goldenberg, W. J. G. Oyen and O. C. Boerman, *J. Nucl. Med.*, 2012, **53**, 947–952.
- 75 Y. Liu, X. Hu, H. Liu, L. Bu, X. Ma, K. Cheng, J. Li, M. Tian, H. Zhang and Z. Cheng, *J. Nucl. Med.*, 2013, **54**, 2132–2138.
- 76 Z. Liu, M. Pourghiasian, M. A. Radtke, J. Lau, J. Pan, G. M. Dias, D. Yapp, K.-S. Lin, F. Bénard and D. M. Perrin, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2014, **53**, 11876–11880.
- 77 D. M. Perrin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2018, **45**, 86–94.
- 78 D. M. Perrin, *Acc. Chem. Res.*, 2016, **49**, 1333–1343.
- 79 E. Vedejs, R. W. Chapman, S. C. Fields, S. Lin and M. R. Schrimpf, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 3020–3027.
- 80 R. Ting, C. W. Harwig, J. Lo, Y. Li, M. J. Adam, T. J. Ruth and D. M. Perrin, , DOI:10.1021/jo800681d.
- 81 Z. Liu, D. Chao, Y. Li, R. Ting, J. Oh and D. M. Perrin, *Chem. - A Eur. J.*, 2014, **21**, 3924–3928.
- 82 Z. Liu, K. S. Lin, F. Bénard, M. Pourghiasian, D. O. Kiesewetter, D. M. Perrin and X. Chen, *Nat. Protoc.*, 2015, **10**, 1423–1432.
- 83 Z. Liu, Y. Li, J. Lozada, M. Q. Wong, J. Greene, K.-S. Lin, D. Yapp and D. M. Perrin, *Nucl. Med. Biol.*, 2013, **40**, 841–849.
- 84 K. Chansaenpak, M. Wang, S. Liu, Z. Wu, H. Yuan, P. S. Conti, Z. Li and F. P. Gabbaï, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 23126–23133.

- 85 Y. Li, Z. Liu, C. W. Harwig, M. Pourghiasian, J. Lau, K.-S. Lin, P. Schaffer, F. Benard and D. M. Perrin, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2013, **3**, 57.
- 86 Z. Liu, M. Pourghiasian, F. Benard, J. Pan, K.-S. Lin and D. M. Perrin, *J. Nucl. Med.*, 2014, **55**, 1499–1505.
- 87 Z. Liu, M. A. Radtke, M. Q. Wong, K. S. Lin, D. T. Yapp and D. M. Perrin, *Bioconjug. Chem.*, 2014, **25**, 1951–1962.
- 88 G. Liu, W. Wang, J. Lin, K. Li, G. Lv, X. Zhao, S. Wang, S. Luo and L. Qiu, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2017, **312**, 599–607.
- 89 Y. Li, Z. Liu, C. W. Harwig, M. Pourghiasian, J. Lau, K.-S. Lin, P. Schaffer, F. Benard and D. M. Perrin, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2013, **3**, 57–70.
- 90 E. Vedejs, S. C. Fields and M. R. Schrimpf, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 11612–11613.
- 91 R. A. Batey and T. D. Quach, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 9099–9103.
- 92 R. Ting, C. Harwig, U. Auf Dem Keller, S. McCormick, P. Austin, C. M. Overall, M. J. Adam, T. J. Ruth and D. M. Perrin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 12045–12055.
- 93 Y. Li, Z. Liu, J. Lozada, M. Q. Wong, K.-S. Lin, D. Yapp and D. M. Perrin, *Nucl. Med. Biol.*, 2013, **40**, 959–966.
- 94 O. Jacobson, L. Zhu, Y. Ma, I. D. Weiss, X. Sun, G. Niu, D. O. Kiesewetter and X. Chen, *Bioconjug. Chem.*, 2011, **22**, 422–428.
- 95 J. Becaude, L. Mu, M. Karamkam, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, K. Graham, T. Stellfeld, L. Lehmann, S. Borkowski, D. Berndorff, L. Dinkelborg, A. Srinivasan, R. Smits and B. Koksche, *Bioconjug. Chem.*, 2009, **20**, 2254–2261.
- 96 Z. Liu, G. Amouroux, Z. Zhang, J. Pan, N. Hundal-Jabal, N. Colpo, J. Lau, D. M. Perrin, F. Bénard and K. S. Lin, *Mol. Pharm.*, 2015, **12**, 974–982.
- 97 Y. Li, J. Guo, S. Tang, L. Lang, X. Chen and D. M. Perrin, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2013, **3**, 44–56.
- 98 K. Chansaenpak, M. Wang, Z. Wu, R. Zaman, Z. Li and F. P. Gabbaï, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 12439–12442.
- 99 J. Lau, Z. Liu, K. S. Lin, J. Pan, Z. Zhang, D. Vullo, C. T. Supuran, D. M. Perrin and F. Bénard, *J. Nucl. Med.*, 2015, **56**, 1434–1440.
- 100 Z. Liu, H. Chen, K. Chen, Y. Shao, D. O. Kiesewetter, G. Niu and X. Chen, *Sci. Adv.*, 2015, **1**, e1500694.
- 101 J. E. Hein and V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1302–1315.
- 102 J. C. Jewett and C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1272–1279.
- 103 E. Saxon and C. R. Bertozzi, *Science (80-)*, 2000, **287**, 2007–2010.
- 104 M. L. Blackman, M. Royzen and J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 13518–13519.
- 105 V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2002, **41**, 2596–2599.
- 106 R. Huisgen, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 1963, **2**, 565–598.
- 107 R. Huisgen, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 1963, **2**, 633–645.
- 108 R. Berg and B. F. Straub, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2013, **9**, 2715–2750.
- 109 M. Ahlquist and V. V. Fokin, *Organometallics*, 2007, **26**, 4389–4391.
- 110 Z. E. Blastik, S. Voltrová, V. Matoušek, B. Jurásek, D. W. Manley, B. Klepetářová and P. Beier, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2017, **56**, 346–349.
- 111 C. Wang, D. Ikhlef, S. Kahlal, J. Y. Saillard and D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.*, 2016, **316**, 1–20.
- 112 N. J. Agard, J. A. Prescher and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 15046–15047.
- 113 N. E. Mbua, J. Guo, M. A. Wolfert, R. Steet and G. J. Boons, *ChemBioChem*, 2011, **12**, 1912–1921.
- 114 I. Nikic, J. H. Kang, G. E. Girona, I. V. Aramburu and E. A. Lemke, *Nat. Protoc.*, 2015, **10**, 780–791.

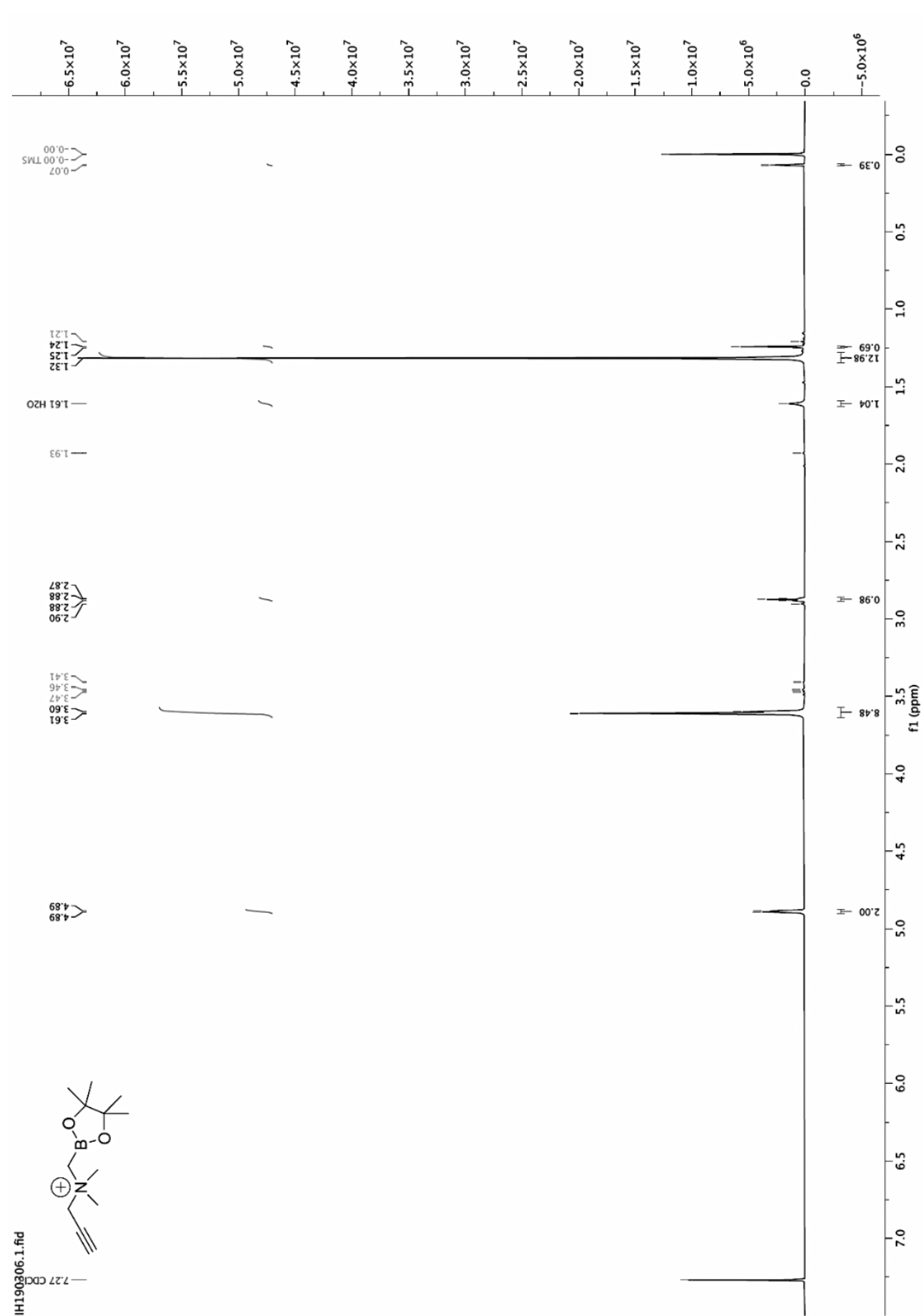
- 115 H. Stöckmann, A. A. Neves, S. Stairs, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle and F. J. Leeper, *Chem. Sci.*, 2011, **2**, 932–936.
- 116 R. B. Turner, A. D. Jarrett, P. Goebel and B. J. Mallon, *Address inquiries to W. Doering, Department of Chemistry*, 1971, vol. 64.
- 117 J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli and C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 16793–16797.
- 118 S. H. Hausner, R. D. Carpenter, N. Bauer and J. L. Sutcliffe, *Nucl. Med. Biol.*, 2013, **40**, 233–239.
- 119 L. Carroll, S. Boldon, R. Bejot, J. E. Moore, J. Declerck and V. Gouverneur, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 136–140.
- 120 B. L. Nilsson, L. L. Kiessling and R. T. Raines, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 9–12.
- 121 M. B. Soellner, B. L. Nilsson and R. T. Raines, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 4993–4996.
- 122 US 2008/0075661 A1, 2008, 27.
- 123 N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo and C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.*, 2006, **1**, 644–648.
- 124 Z. Li, H. Cai, M. Hassink, M. L. Blackman, R. C. D. Brown, P. S. Conti and J. M. Fox, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 8043–8045.
- 125 R. Selvaraj, S. Liu, M. Hassink, C. W. Huang, L. P. Yap, R. Park, J. M. Fox, Z. Li and P. S. Conti, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 5011–5014.
- 126 R. Selvaraj and J. M. Fox, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2013, **17**, 753–760.
- 127 R. D. Bach, , DOI:10.1021/ja8094137.
- 128 E. Ruivo, F. Elvas, K. Adhikari, C. Vangestel, G. Van Haesendonck, F. Lemièrre, S. Staelens, S. Stroobants, P. Van Der Veken, L. Wyffels, K. Augustyns, O. Keinänen, X. G. Li, N. K. Chenna, D. Lumen, J. Ott, C. F. M. Molthoff, M. Sarparanta, K. Helariutta, T. Vuorinen, A. D. Windhorst and A. J. Airaksinen, *ACS Omega*, 2016, **7**, 4449–4456.
- 129 O. Keinänen, X. G. Li, N. K. Chenna, D. Lumen, J. Ott, C. F. M. Molthoff, M. Sarparanta, K. Helariutta, T. Vuorinen, A. D. Windhorst and A. J. Airaksinen, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2016, **7**, 62–66.
- 130 M. R. Lewis, M. Wang, D. B. Axworthy, L. J. Theodore, R. W. Mallet, A. R. Fritzberg, M. J. Welch and C. J. Anderson, *J. Nucl. Med.*, 2003, **44**, 1284–1292.
- 131 B. M. Zeglis, K. K. Sevak, T. Reiner, P. Mohindra, S. D. Carlin, P. Zanzonico, R. Weissleder and J. S. Lewis, *J. Nucl. Med.*, 2013, **54**, 1389–1396.
- 132 R. Rossin, P. R. Verkerk, S. M. Van Den Bosch, R. C. M. Volders, I. Verel, J. Lub and M. S. Robillard, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2010, **49**, 3375–3378.
- 133 Z. Liu, , DOI:10.14288/1.0167333.
- 134 J. M. Link, S. C. Shoner and K. A. Krohn, *AIP Conf. Proc.*, 2012, **1509**, 61–65.
- 135 V. S., *Molecular Imaging : Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*, Springer, Dordrecht ; London, 2009.
- 136 O. Keinänen, X. G. Li, N. K. Chenna, D. Lumen, J. Ott, C. F. M. Molthoff, M. Sarparanta, K. Helariutta, T. Vuorinen, A. D. Windhorst and A. J. Airaksinen, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2016, **7**, 62–66.
- 137 A. A. W. L. Wong, J. Lozada, M. L. Lepage, C. Zhang, H. Merkens, J. Zeisler, K. S. Lin, F. Bénard and D. M. Perrin, *RSC Med. Chem.*, 2020, **11**, 569–576.
- 138 A. Khoshnevisan, M. Jauregui-Osoro, K. Shaw, J. B. Torres, J. D. Young, N. K. Ramakrishnan, A. Jackson, G. E. Smith, A. D. Gee and P. J. Blower, *EJNMMI Res.*, , DOI:10.1186/s13550-016-0188-5.
- 139 H. Sierra, M. Cordova, C. S. J. Chen and M. Rajadhyaksha, *J. Invest. Dermatol.*, 2015, **135**, 612–615.

Liitteet

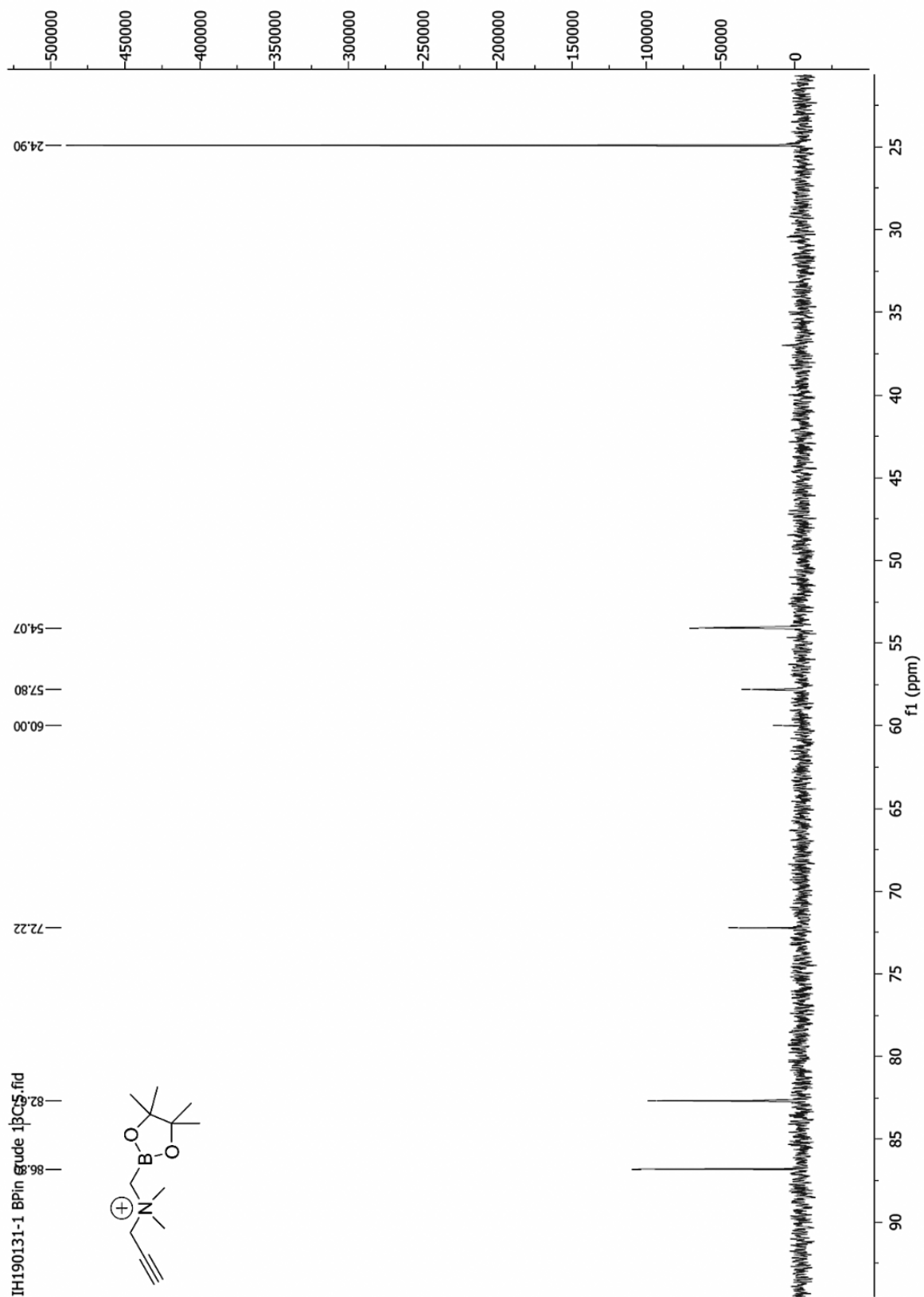
Lista liitteistä:

- Liite 1.** Raakatuotteen AMBPin ^1H -NMR spektri.
- Liite 2.** Raakatuotteen AMBPin ^{13}C -NMR spektri.
- Liite 3.** Raakatuotteen AMBPin ^{11}B -NMR spektri.
- Liite 4.** Puhtaan $\text{AMBF}_3\text{:n}$ ^1H -NMR spektri.
- Liite 5.** Puhtaan $\text{AMBF}_3\text{:n}$ ^{13}C -NMR spektri.
- Liite 6.** Puhtaan $\text{AMBF}_3\text{:n}$ ^{19}F -NMR spektri.
- Liite 7.** Puhtaan $\text{AMBF}_3\text{:n}$ ^{11}B -NMR spektri.
- Liite 8.** ESI-TOF-MS AMBF_3
- Liite 9.** Puhtaan $\text{AMBF}_3\text{-PEG}_4\text{-mTz:n}$ ^1H -NMR spektri.
- Liite 10.** Puhtaan $\text{AMBF}_3\text{-PEG}_4\text{-mTz:n}$ ^{19}F -NMR spektri.
- Liite 11.** ESI-TOF-MS $\text{AMBF}_3\text{-PEG}_4\text{-mTz}$
- Liite 12.** N,N-dimetyyli-2-propargyyliamiinin ^1H -NMR spektri.
- Liite 13.** N,N-dimetyyli-2-propargyyliamiinin ^{13}C -NMR spektri.
- Liite 14.** Jodimetyyliboorihapon pinakoliesterin ^1H -NMR spektri.
- Liite 15.** Jodimetyyliboorihapon pinakoliesterin ^{13}C -NMR spektri.
- Liite 16.** Jodimetyyliboorihapon pinakoliesterin ^{11}B -NMR spektri.
- Liite 17.** mTz- PEG_4 -atsidia ^1H -NMR spektri.
- Liite 18.** mTz- PEG_4 -atsidia ^{13}C -NMR spektri.
- Liite 19.** [^{18}F]1 synteesikaavio ja synteesiyksikkö (Hot Cell 2).

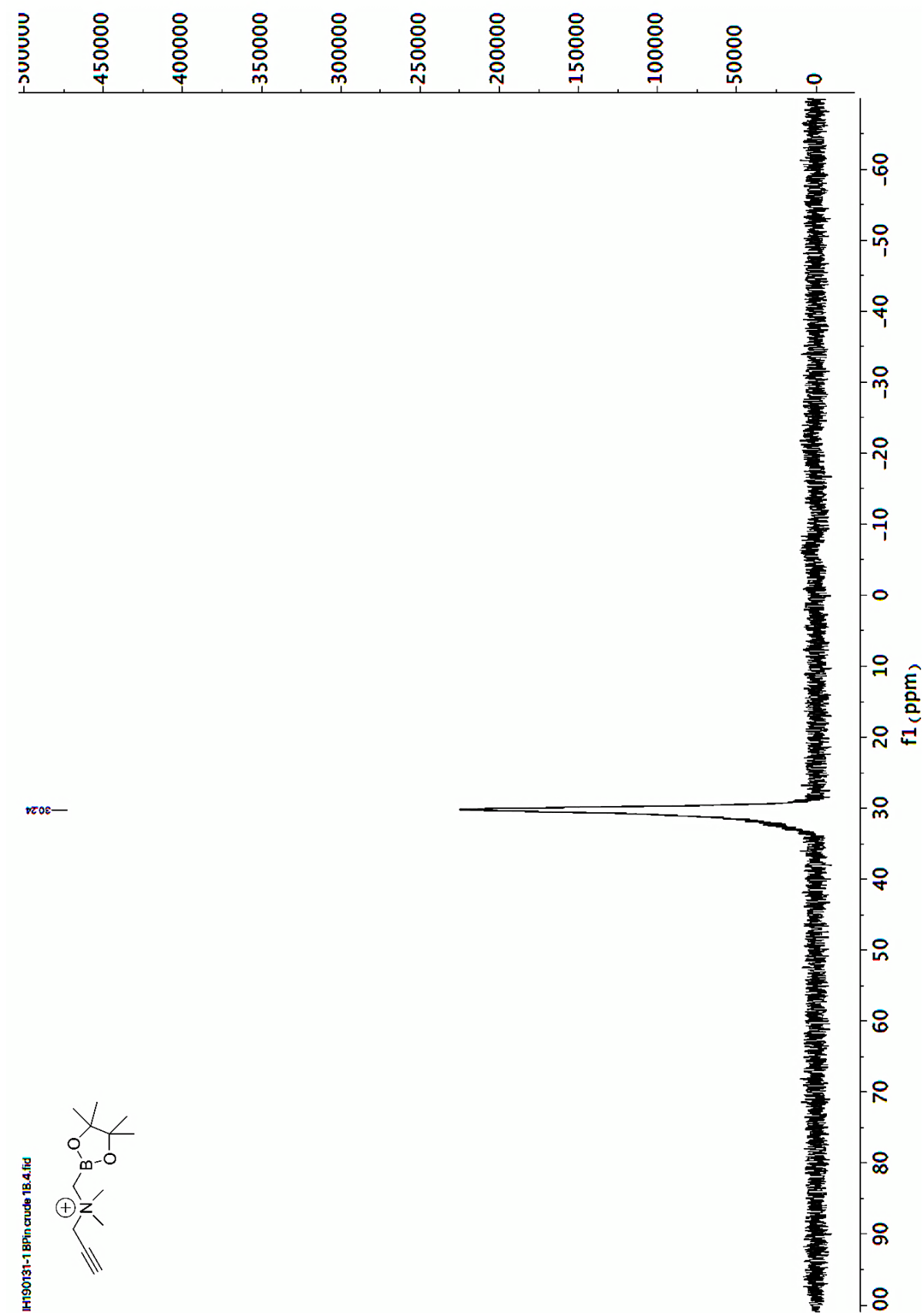
Liite 1. Raakatuotteen AMBP:n ^1H -NMR spektri.



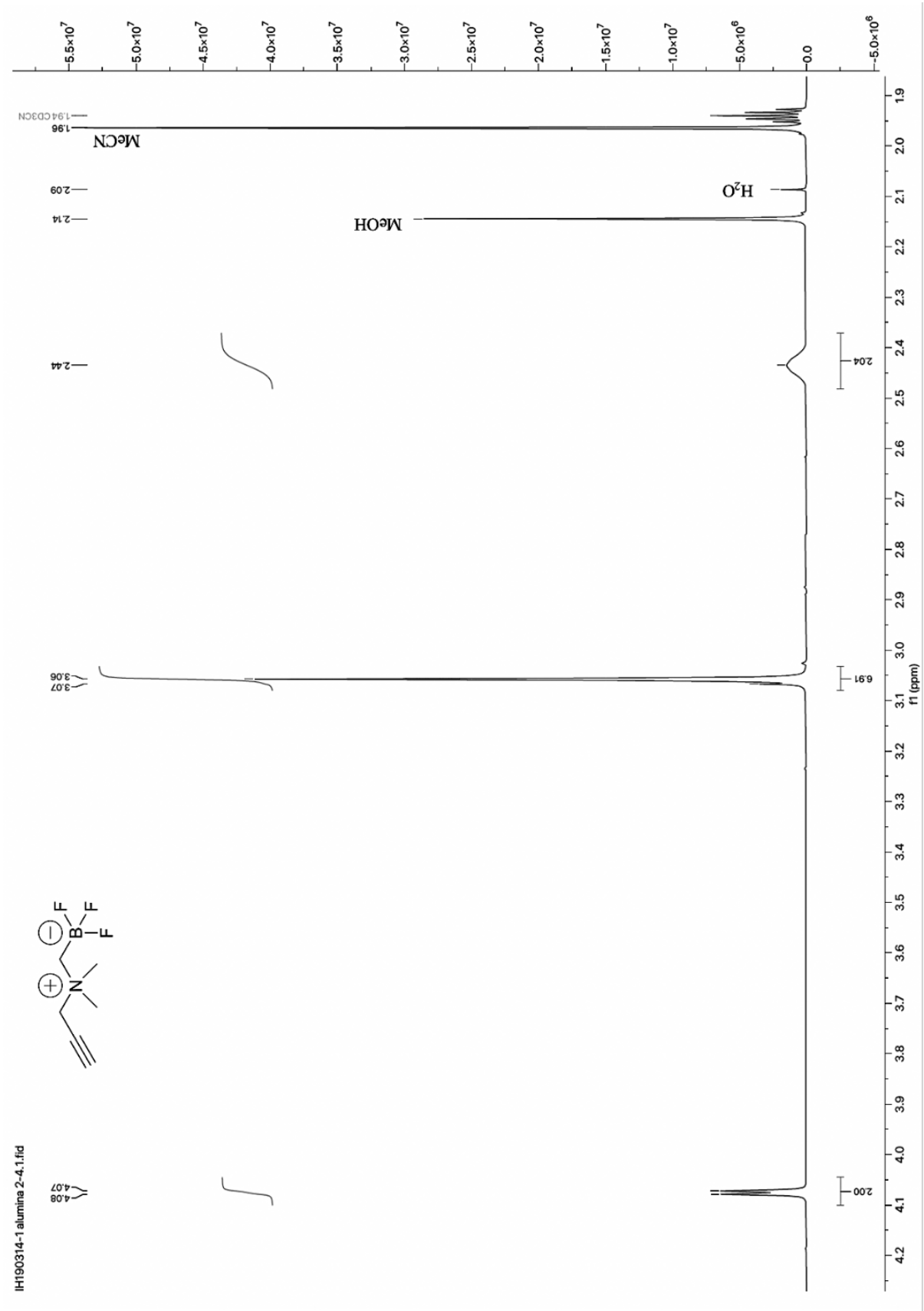
Liite 2. . Raakatuotteen AMBPin ^{13}C -NMR spektri.



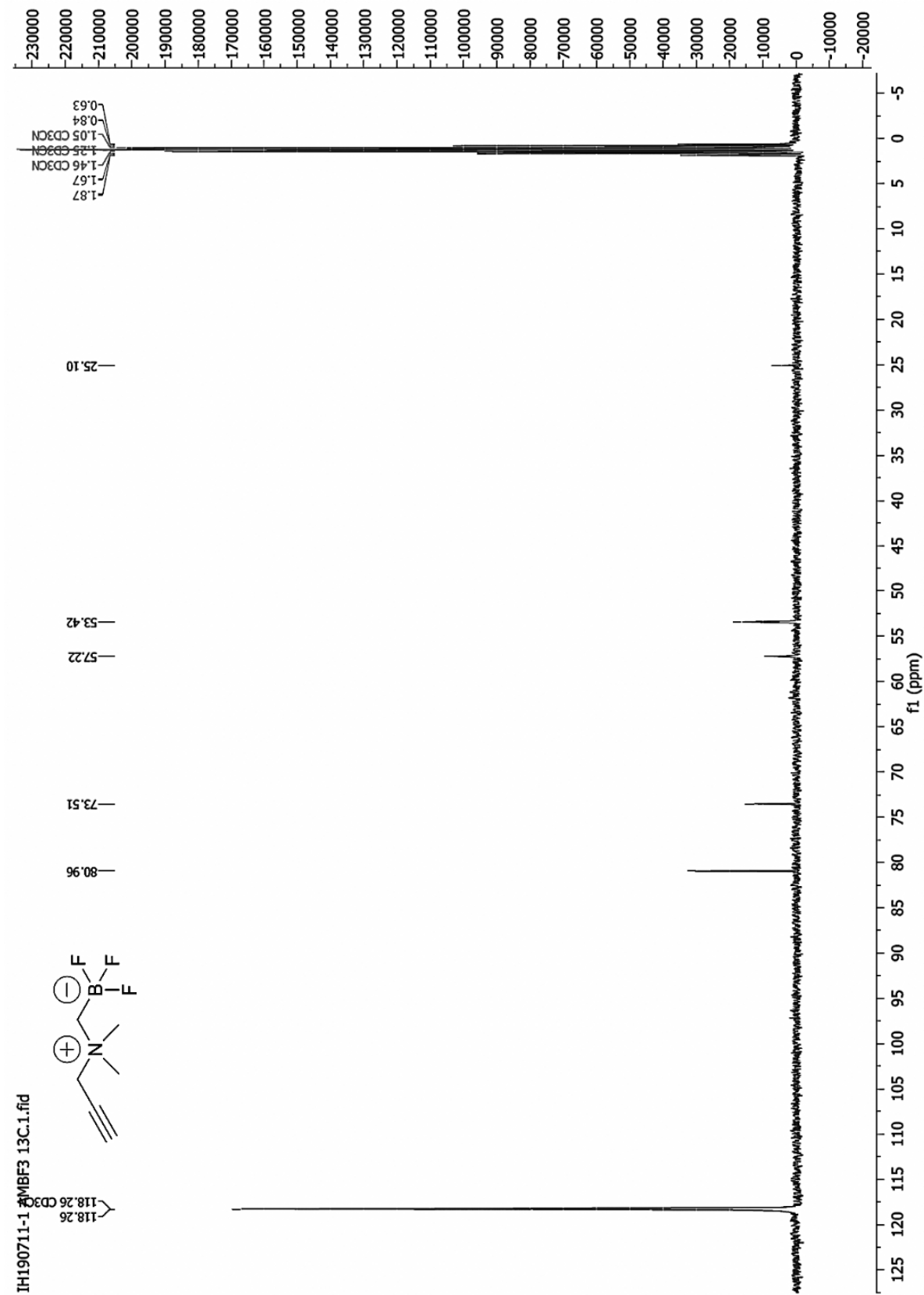
Liite 3. Raakatuotteen AMBPIn ^{11}B -NMR spektri.



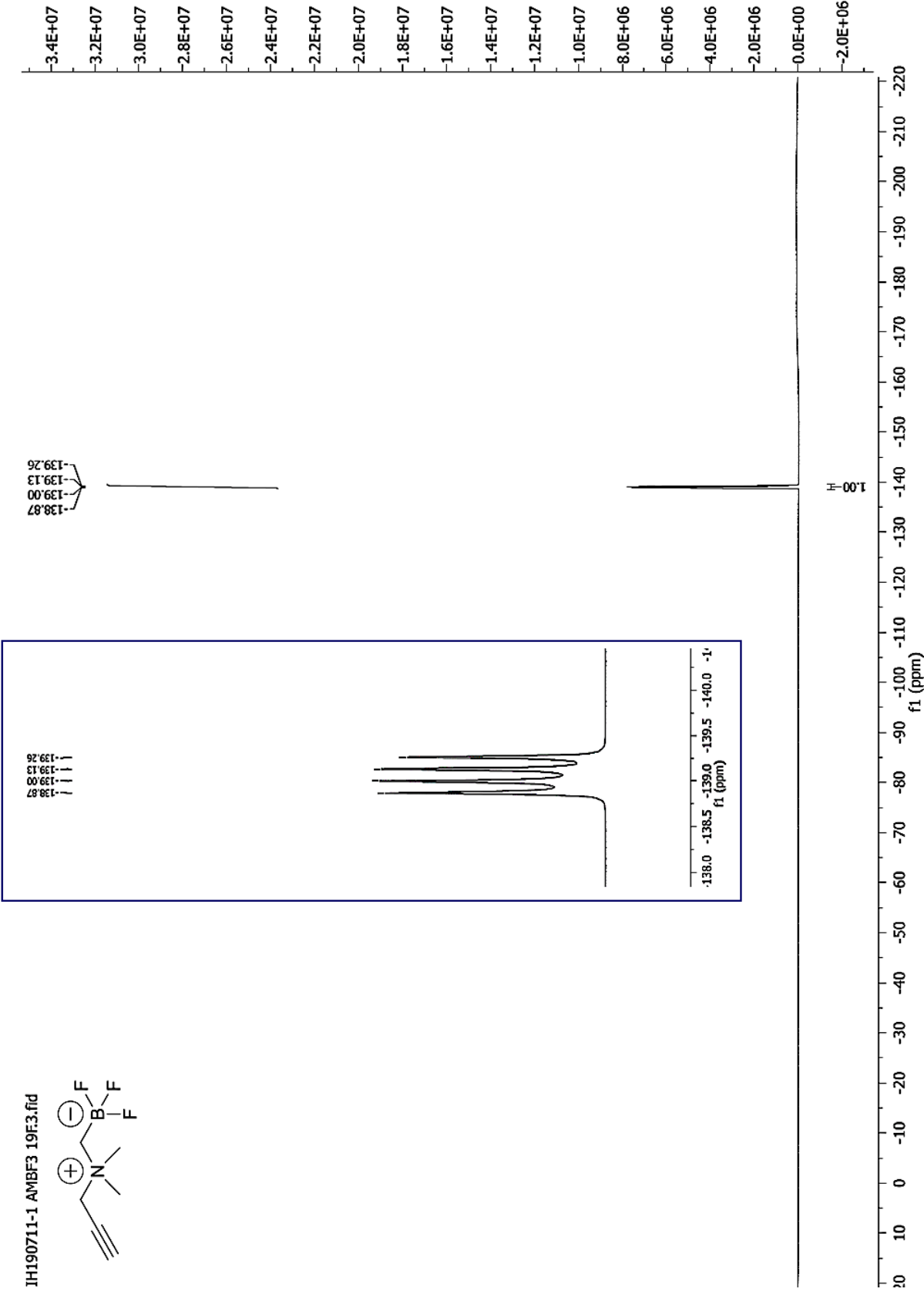
Liite 4. Puhtaan AMBF₃:n ¹H-NMR spektri.



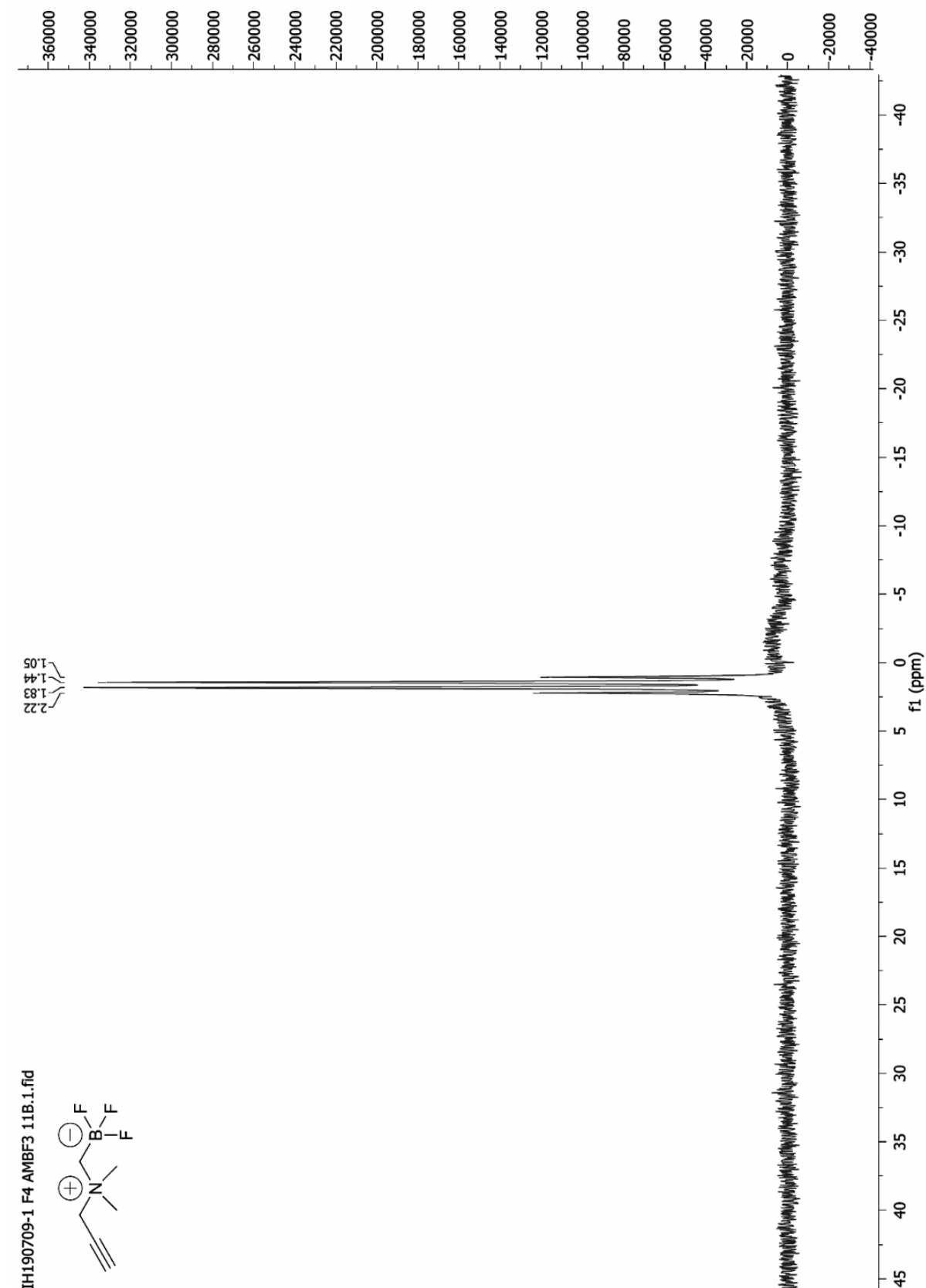
Liite 5. Puhtaan AMBF₃:n ¹³C-NMR spektri.



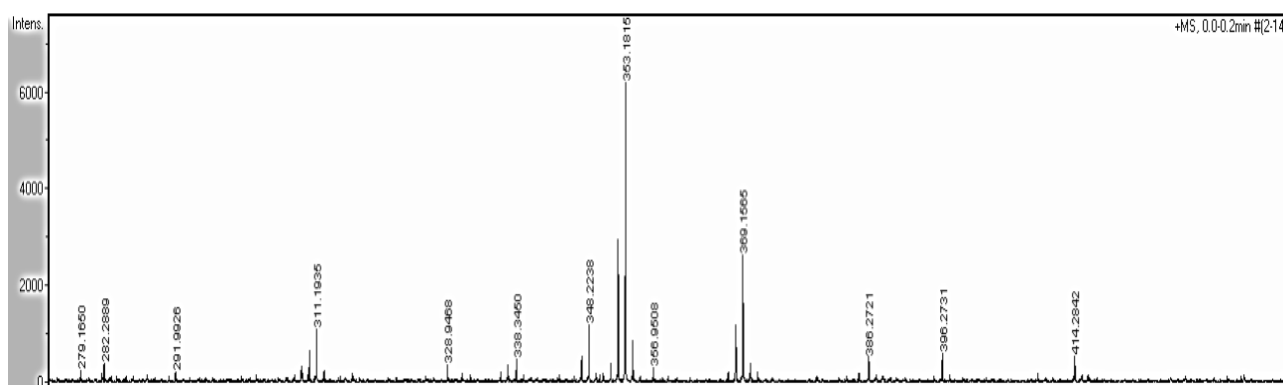
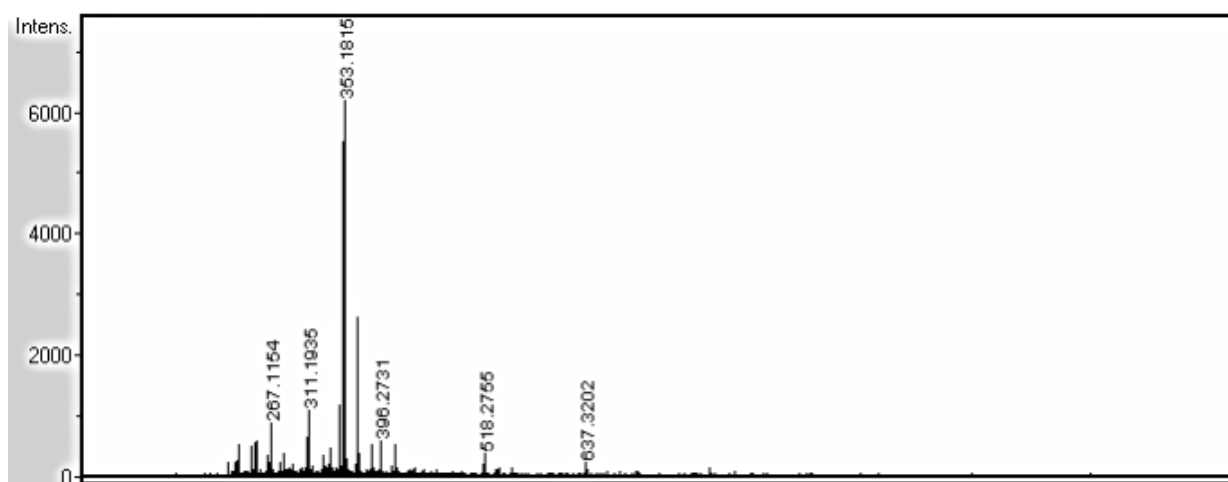
Liite 6. Puhtaan AMBF₃:n ¹⁹F-NMR spektri.



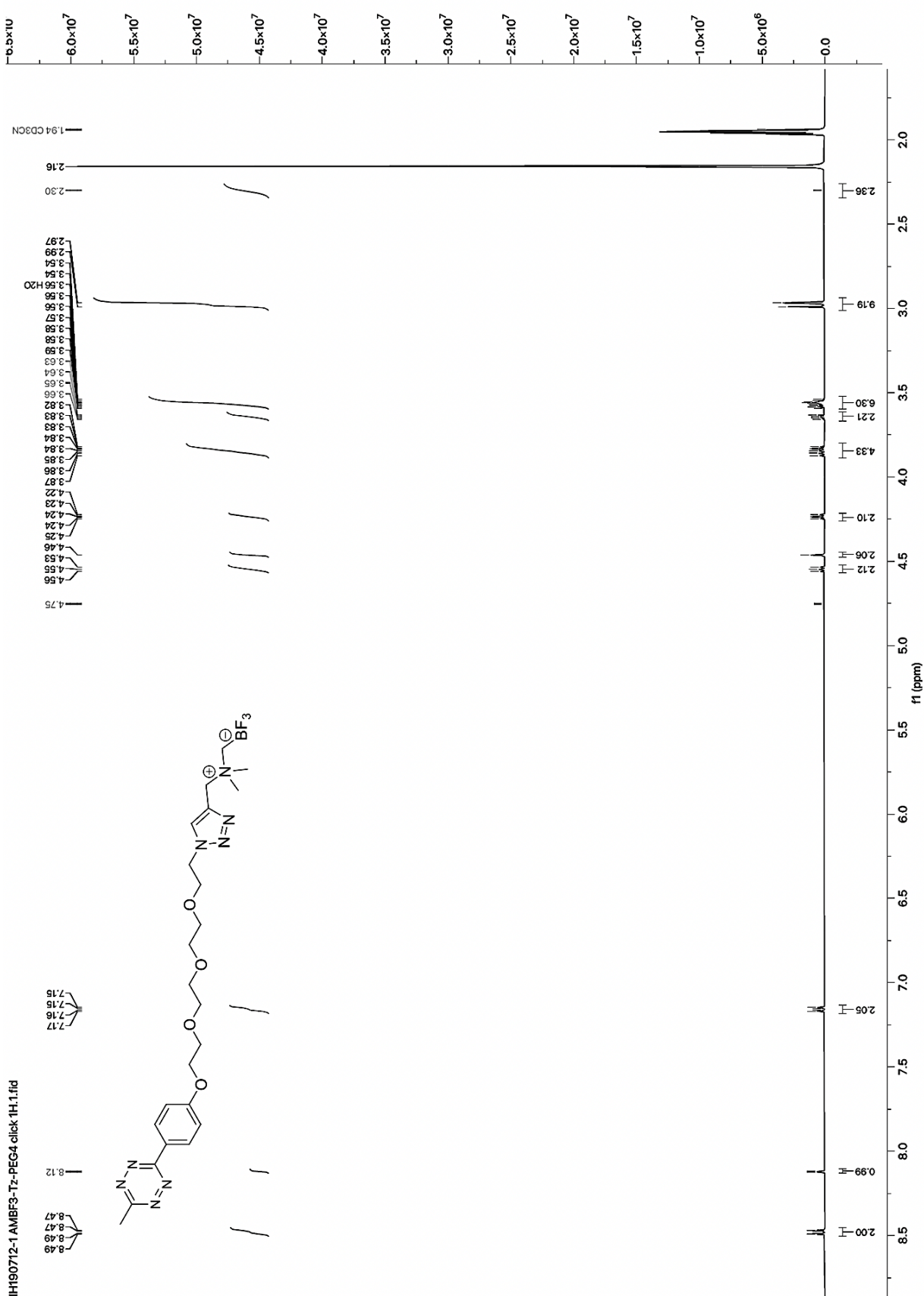
Liite 7. Puhtaan AMBF₃:n ¹¹B-NMR spektri.



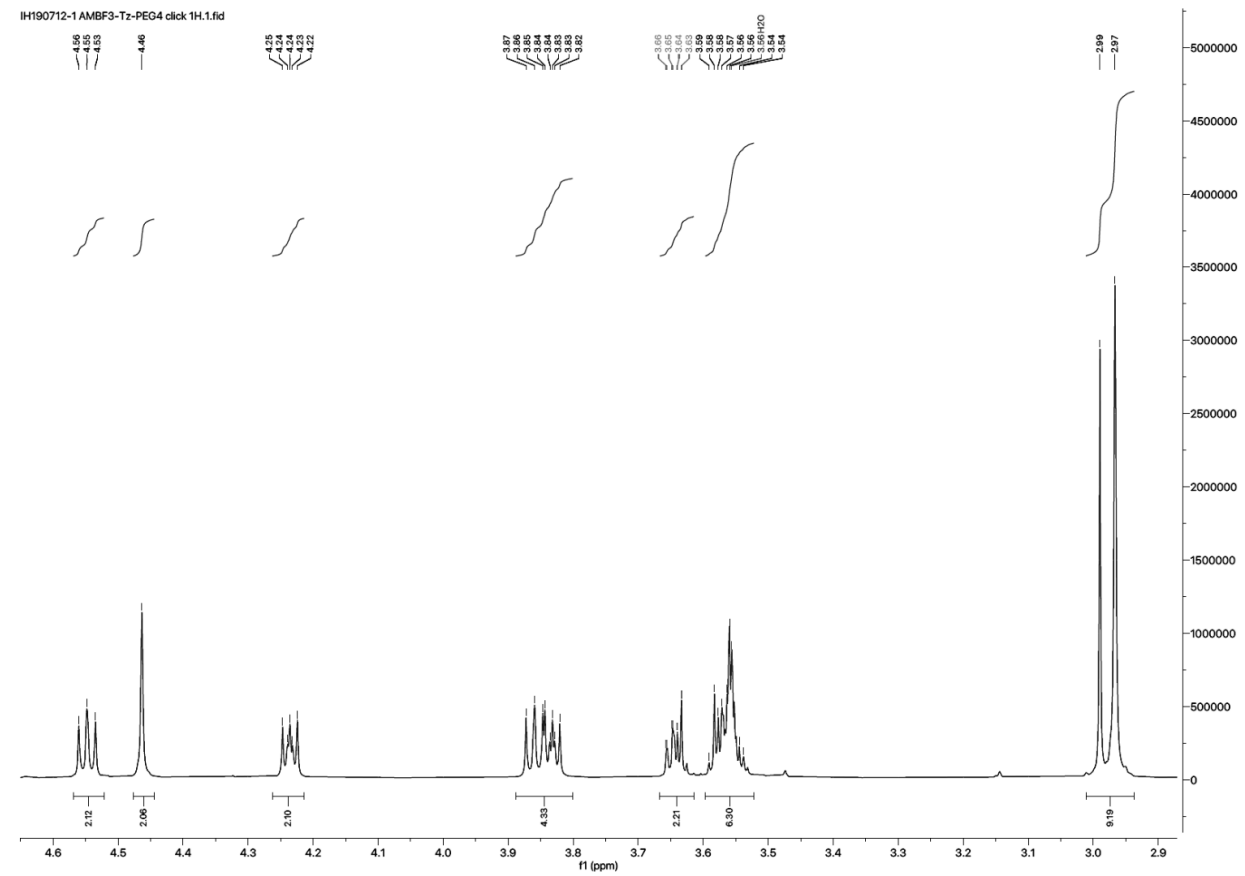
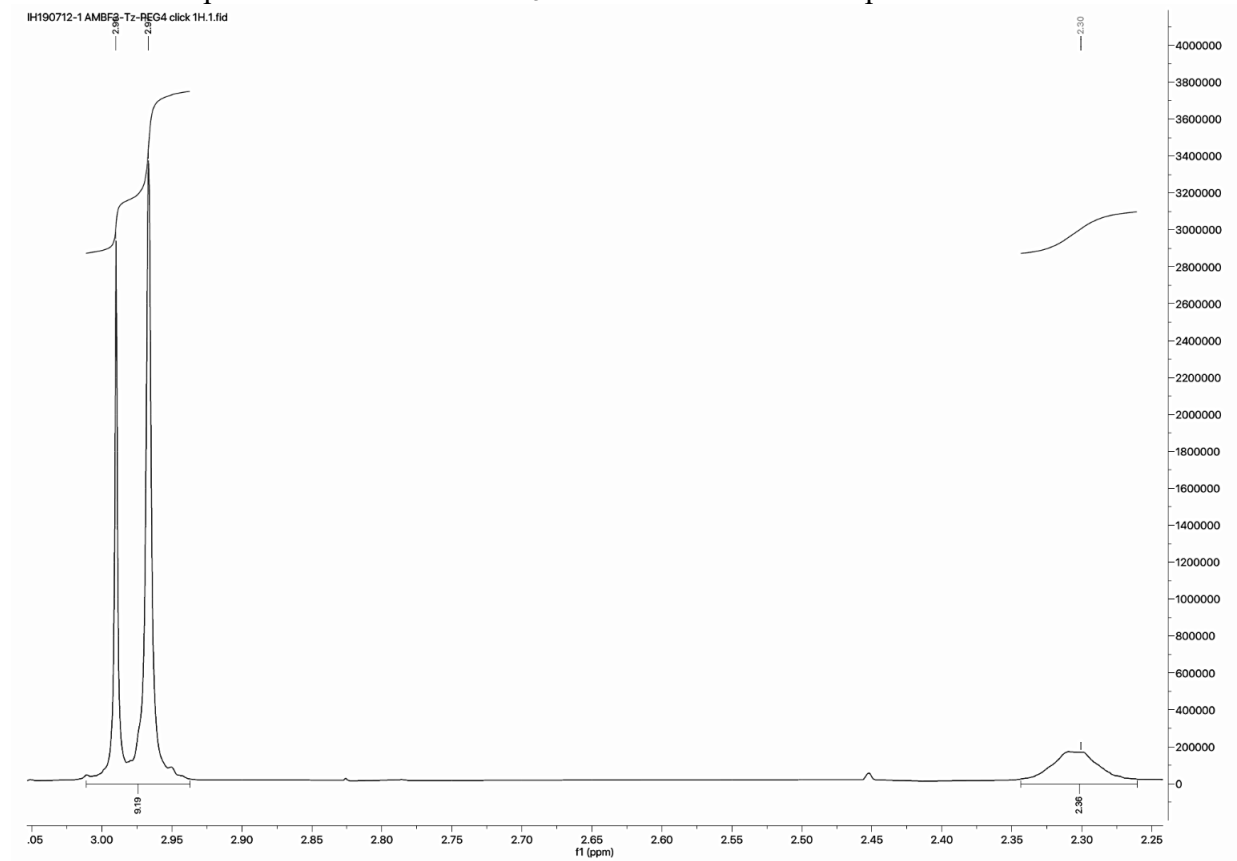
Liite 8. ESI-TOF-MS AMBF₃



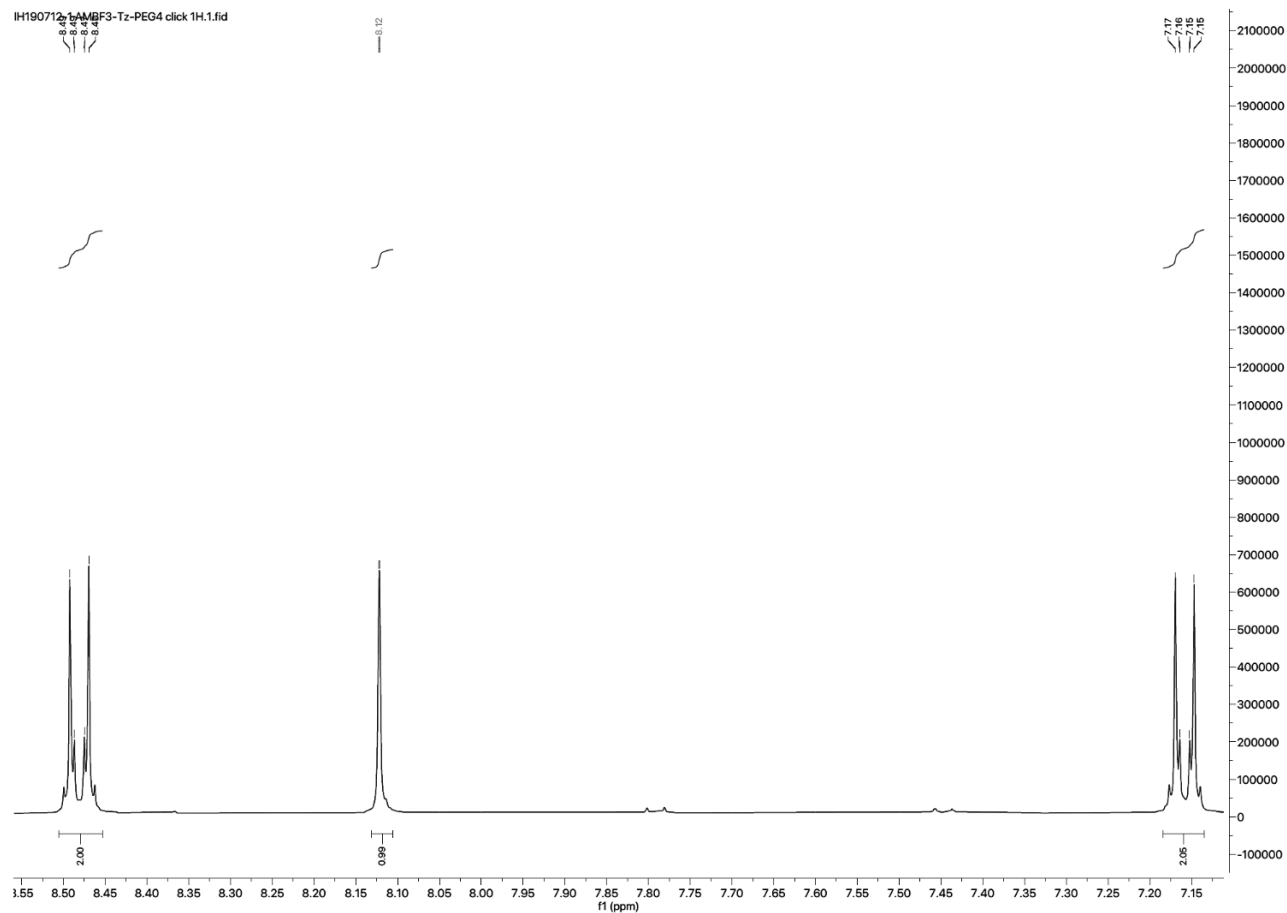
Liite 9. Puhtaan AMBF₃-PEG₄-mTz:n ¹H-NMR spektri.

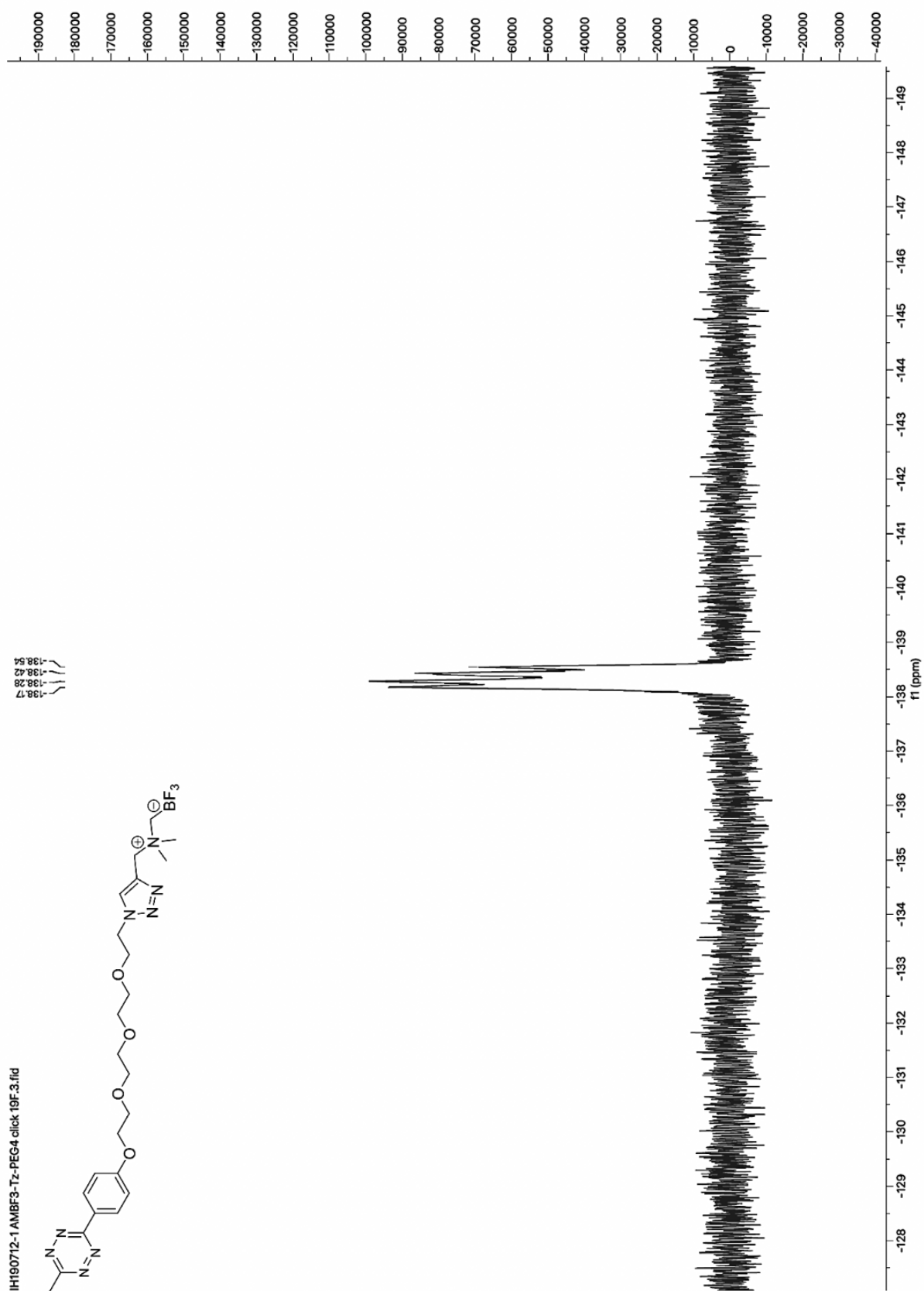


Suurenokset spektristä: Puhtaan AMBF₃-PEG₄-mTz:n ¹H-NMR spektri

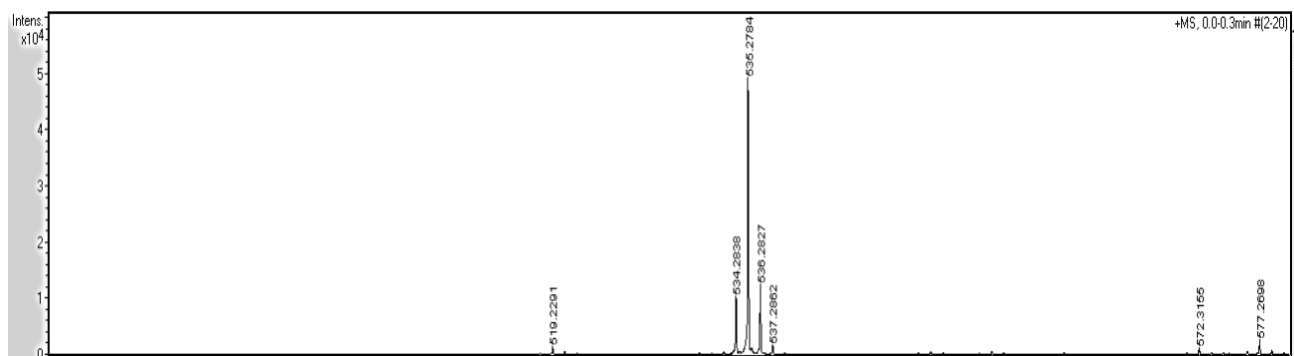
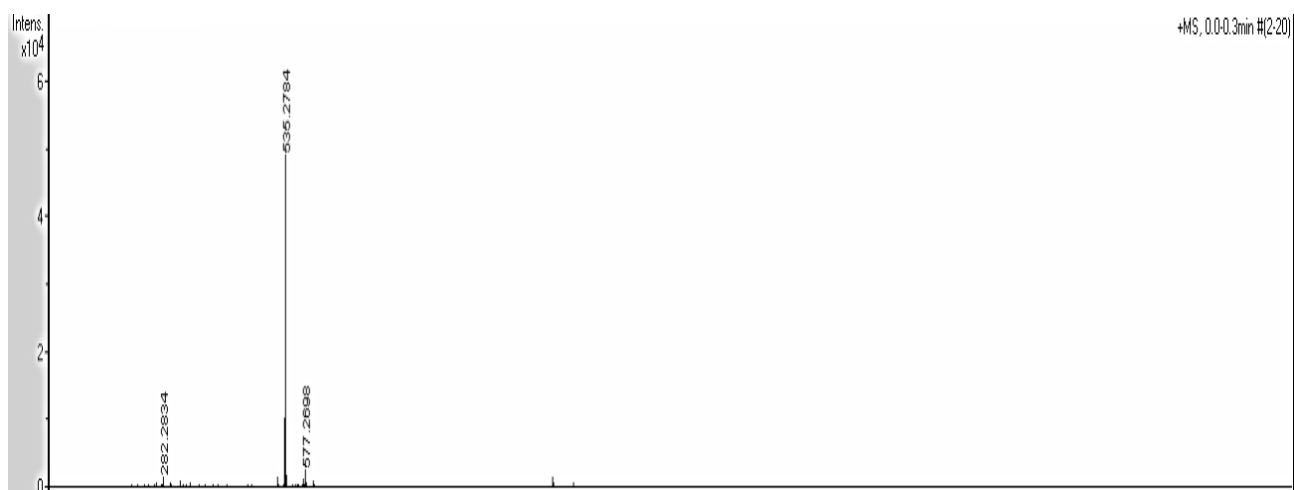


IH190712-1-AMBF3-Tz-PEG4 click 1H.1.fid

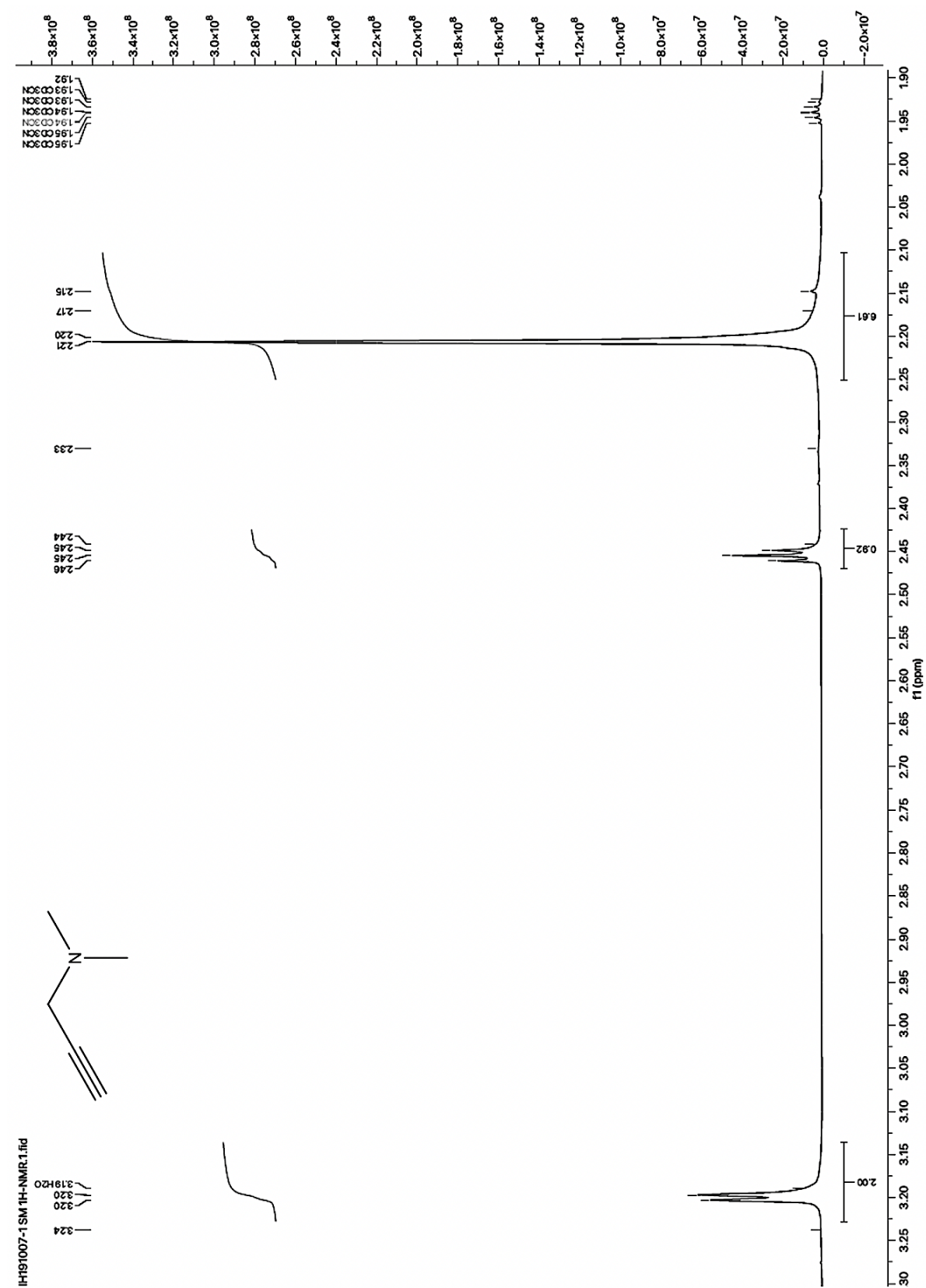


Liite 10. Puhtaan AMBF₃-PEG₄-mTz:n ¹⁹F-NMR spektri.

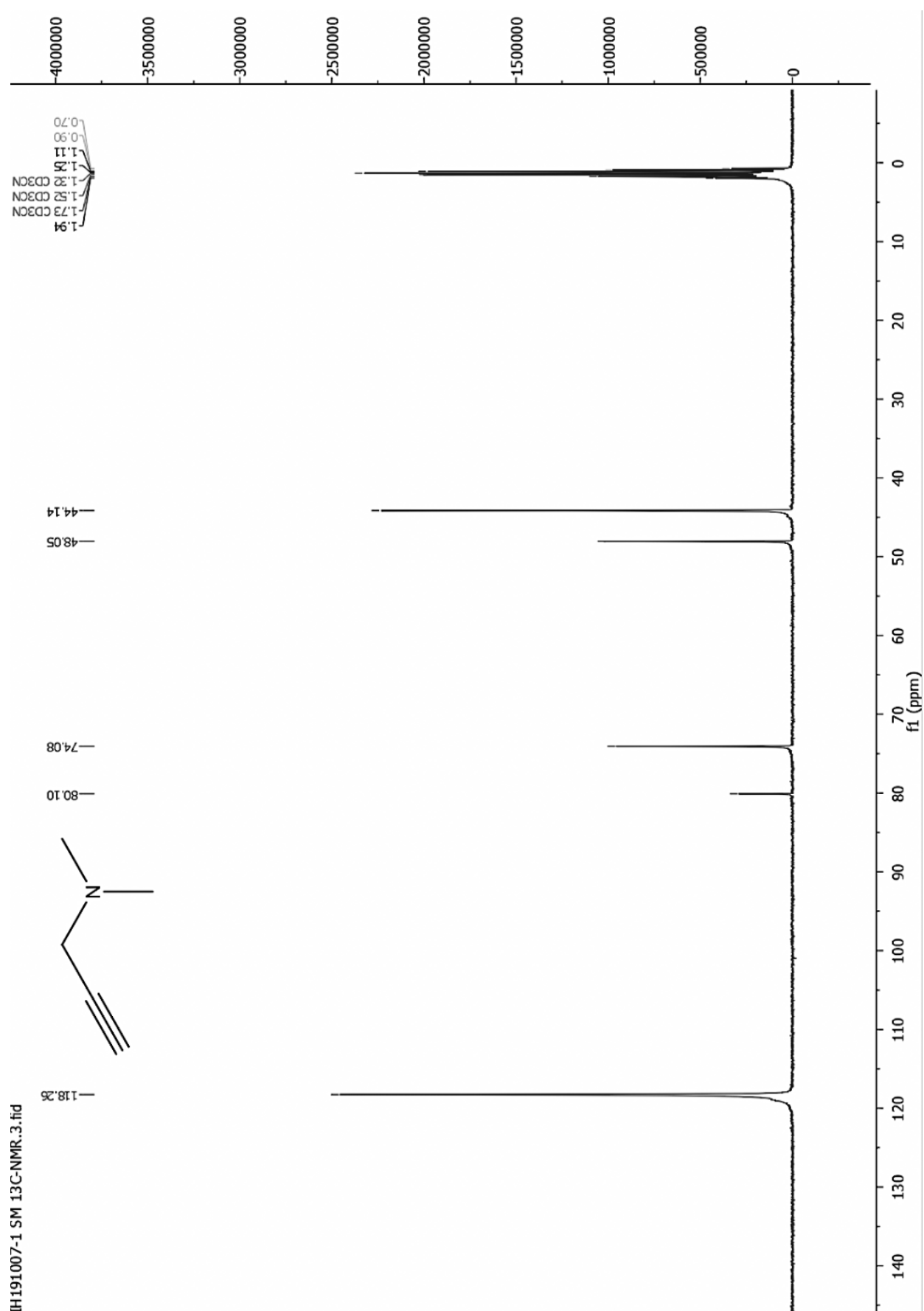
Liite 11. ESI-TOF-MS AMBF₃-PEG₄-mTz



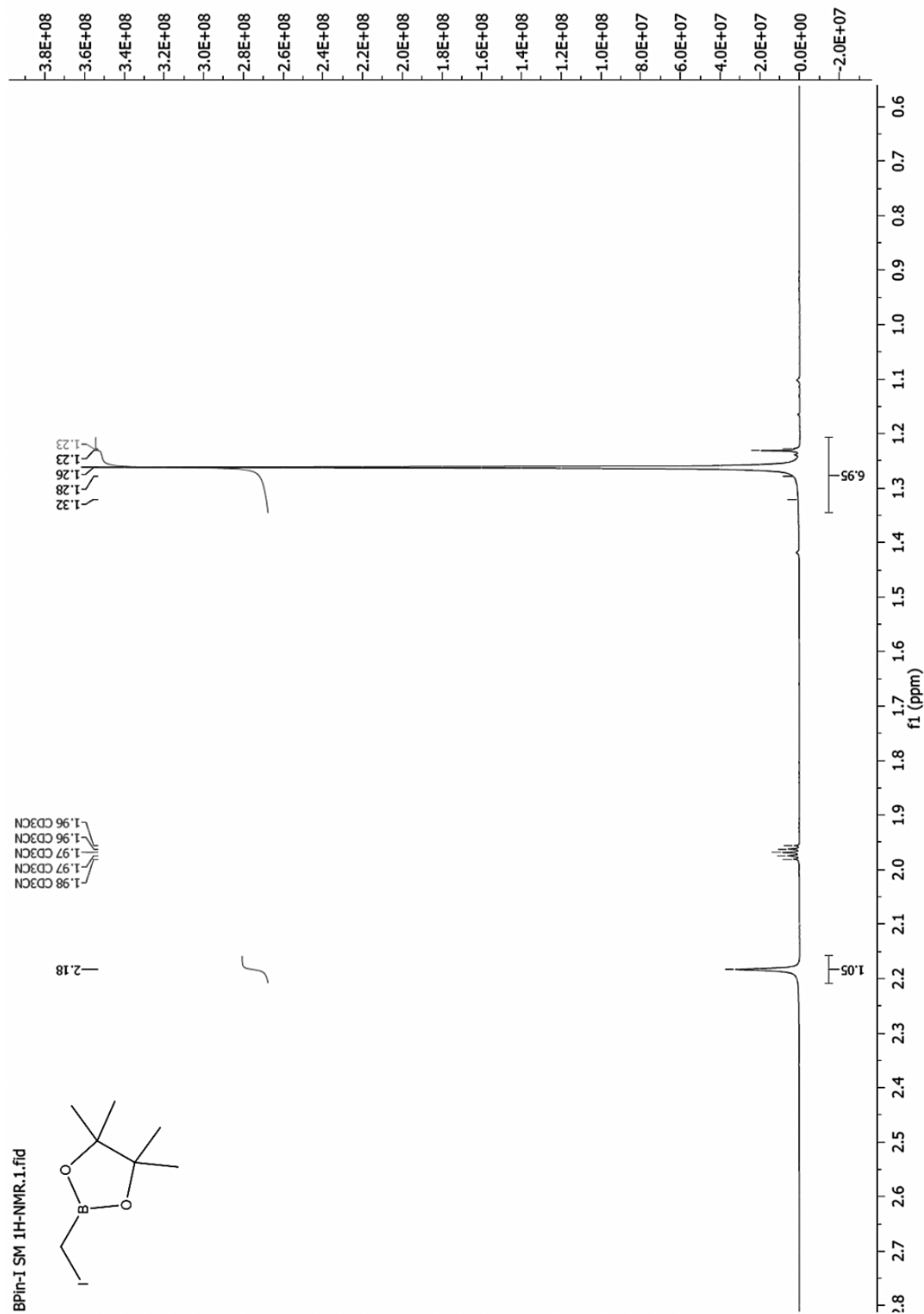
Liite 12. N,N-dimetyyli-2-propargyyliamiinin ^1H -NMR spektri.



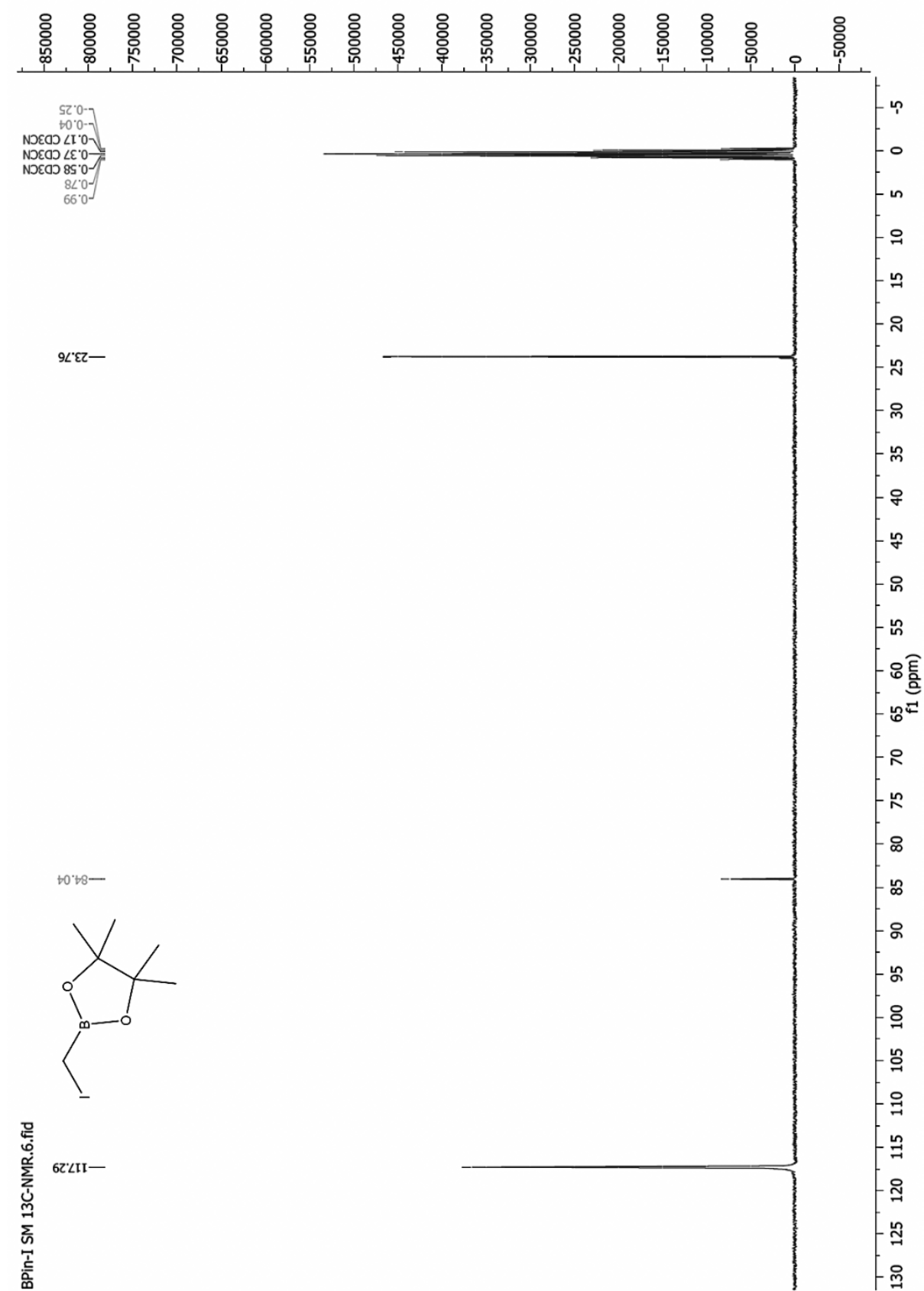
Liite 13. N,N-dimetyyli-2-propargyyliamiinin ^{13}C -NMR spektri.



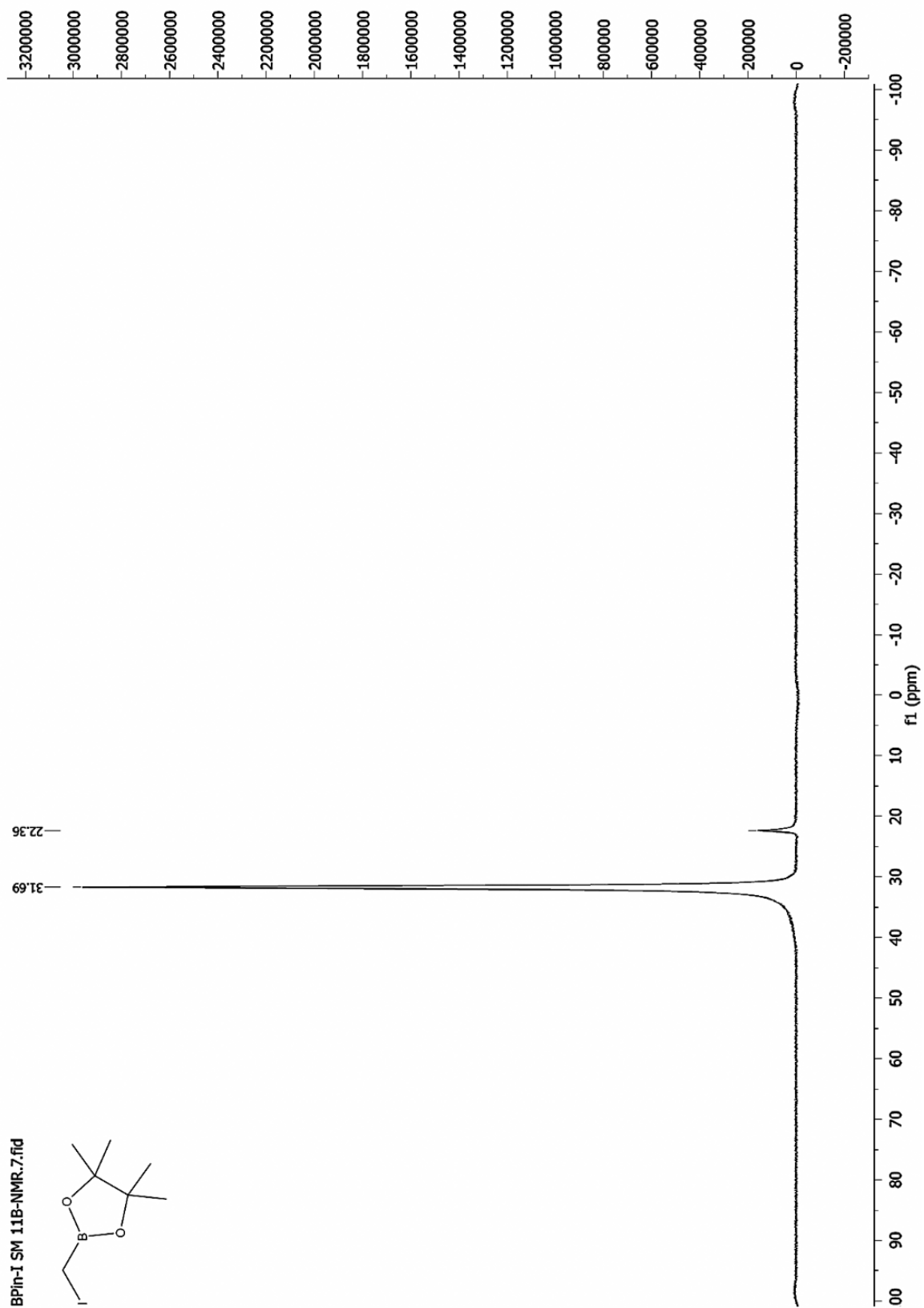
Liite 14. Jodimetyyliboorihapon pinakoliesterin ¹H-NMR spektri.



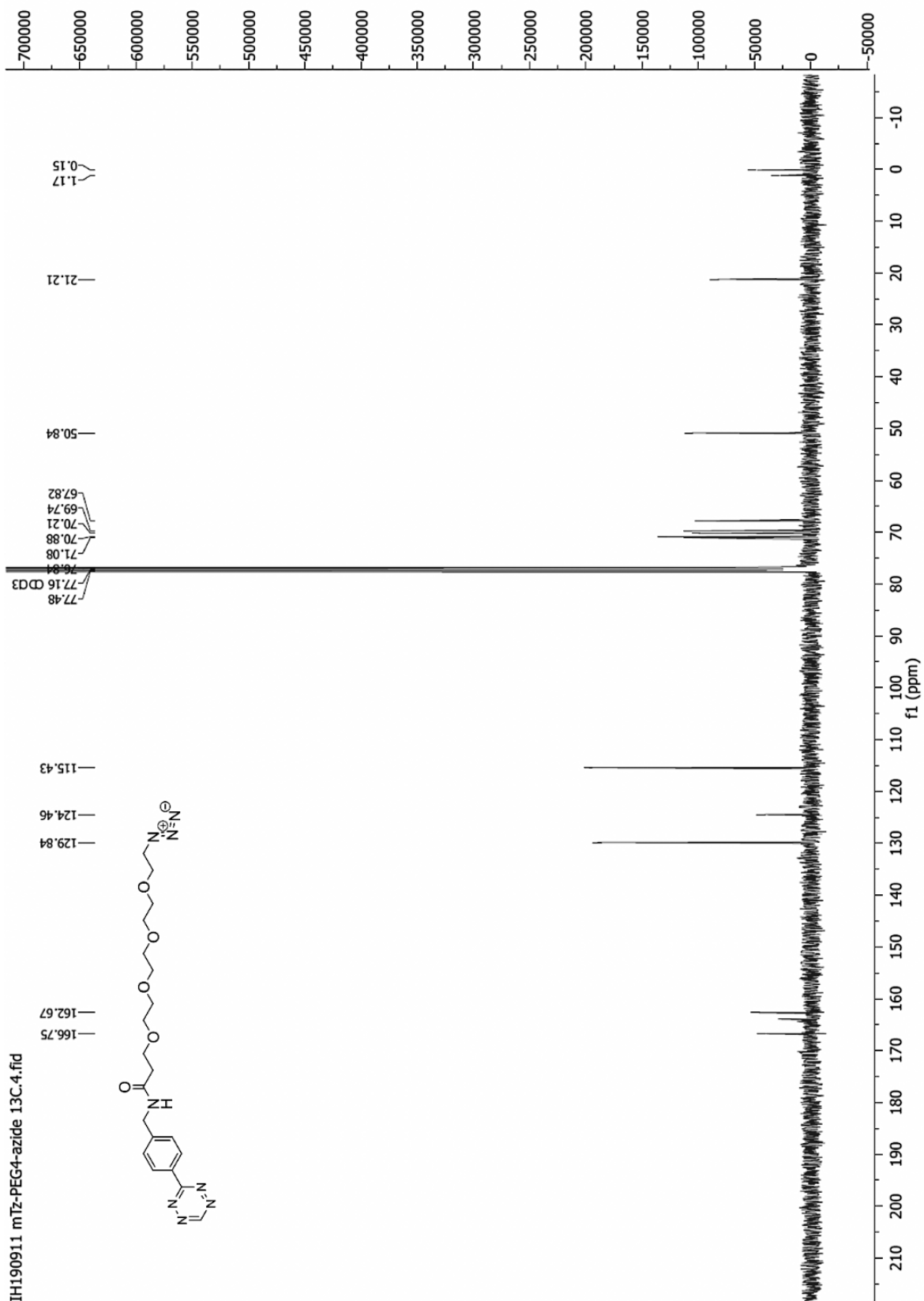
Liite 15. Jodimetyyliboorihapon pinakoliesterin ^{13}C -NMR spektri.



Liite 16. Jodimetyyliboorihapon pinakoliesterin ^{11}B -NMR spektri.



Liite 18. mTz-PEG₄-atsidia ¹³C-NMR spektri.



Liite 19. [^{18}F]1 synteesikaavio ja synteesiyksikkö (Hot Cell 2).

